

**Einfluß von Interleukin 6 (IL6) auf die Expression von  
Peptidrezeptoren an peripheren Neuronen der Hinterwurzelganglien  
der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae (Dr.med.dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich – Schiller – Universität Jena

von **Michaela Kiehl**

geboren am 01.10.1979 in Weißenfels

19.11.2004

Erster Gutachter: .....

Zweiter Gutachter: .....

Dritter Gutachter: .....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

# Abkürzungsverzeichnis

## Eigene Abkürzungen:

ABC	Avidin – Biotin - Komplex
AIA	Antigen – induzierte Arthritis
BK	Bradykinin
B1 – Rezeptor	Bradykinin 1 – Rezeptor
B2 – Rezeptor	Bradykinin 2 – Rezeptor
BSA	Rinderserum – Albumin
BSA – C	Rinderserum – Albumin – C
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium – Ion
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene – related peptide
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DePeX	Kunstharz
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Dorsal root ganglion (Hinterwurzelganglien)
ELISA	Enzym – linked – immunosorbent - assay
Gp 130	Glykoprotein 130
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
INF <sub>γ</sub>	Interferon γ
IL6	Interleukin 6
IL6-R	Interleukin 6 – Rezeptor
JAK1 - 3	Januskinase 1 - 3
LIF	Leukemia inhibiting factor
Mek-Kinase	Mitogen – activated – Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGF	Nerve growth factor

NK1 - Rezeptor	Neurokinin 1 – Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PIAS	Protein of activated STAT
PKA	Proteinkinase A
Raf	Proteinkinase
Ras	Protein mit GTP-ase Aktivität
rpm	repeats per minutes
sIL6-R	löslicher Interleukin 6 – Rezeptor
SOCS	suppressor of cytokine signalling
SOS	Son of sevenless
SP	Substanz P
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$

#### Einheiten:

d	Durchmesser
h	Stunde
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
m/s	Meter/Sekunde
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
pg	Pikogramm
s	Sekunde
U/ml	Unit/Milliliter
$\mu$ g	Mikrogramm

$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromol
$\mu\text{m}^2$	Quadratmikrometer

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1. Rheumatismus	3
1.1.1. Die rheumatoide Arthritis	3
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	3
1.2. Schmerz	4
1.2.1. Das nozizeptive System	6
1.2.2. Sensibilisierung der Nozizeptoren	6
1.2.3. Die neurogene Entzündung	8
1.2.4. Neurone der Hinterwurzelganglien (DRG – Neurone) adulter Ratten als Modell für den peripheren Nozizeptor	10
1.3. Die Antigen – induzierte Arthritis (AIA)	11
1.4. Der NK1 – Rezeptor	11
1.5. Der B2 – Rezeptor	12
1.6. Die Regulation des NK1 – und des B2 – Rezeptors durch Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )	12
1.7. Einfluß von IL6 auf die NK1 – und B2 – Rezeptorexpression	13
1.7.1. Struktur von IL6	14
1.7.2. Expression von IL6	15
1.7.3. Funktion von IL6	15
1.7.4. Signaltransduktion von IL6	17
<b>2. Zielstellung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1. Versuchstiere	21
3.2. Vorbereitung der Präparation	21
3.2.1. Vorbereitung des Nährmediums Ham`s F12 + Nährmedium	21
3.2.2. Vorbereitung der Deckgläschen	21
3.2.3. Vorbereitung der Tiere	22
3.3. Präparation der Hinterwurzelganglien (DRG)	22

3.3.1.	Präparation der Wistar – Ratte	22
3.3.2.	Isolierung der Hinterwurzelganglien	23
3.3.3.	Herstellung der Neuronenkultur	23
3.3.3.1.	Kollagenasebehandlung	23
3.3.3.2.	Trypsinbehandlung	24
3.3.3.3.	Vereinzelung der Neurone	24
3.4.	Regulationsversuche	25
3.4.1.	Interleukin 6 (IL6) – Zugabe	25
3.4.2.	Mek-Kinase – Inhibitor	25
3.4.3.	Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) – Zugabe	26
3.4.4.	Indomethacin – Zugabe	26
3.4.5.	Enzym – linked – immunosorbent – assay (ELISA) zur PGE <sub>2</sub> – Gehaltbestimmung der Überstände	26
3.4.6.	Kalzium - Imaging – Technik	28
3.5.	Rezeptormarkierungen	29
3.5.1.	NK1 – Markierung (siehe auch Tabelle 1)	29
3.5.2.	Markierung des Glykoprotein 130 (siehe auch Tabelle 1)	31
3.5.3.	Darstellung von Bradykininrezeptoren mit Gold – gekoppeltem Bradykinin	32
3.6.	Darstellung des Glykoprotein 130 an histologischen Schnitten von DRG`s	33
3.7.	Datenerfassung und Auswertung	34
3.8.	Materialien	35
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	39
4.1.	Regulation des Neurokinin 1 – Rezeptors (NK1 – Rezeptor)	39
4.1.1.	Expression des NK1 – Rezeptors in Abhängigkeit von Interleukin 6 (IL6)	39
4.1.2.	Expression des NK1 – Rezeptors in Abhängigkeit von IL6 zu- sammen mit dem Mek-Kinase – Inhibitor	43
4.1.3.	Expression des NK1 – Rezeptors in Abhängigkeit von PGE <sub>2</sub> und Mek-Kinase – Inhibitor	45
4.1.4.	Einfluß von IL6 auf die Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) – Sekretion in der DRG - Neuronenkultur	46

4.1.5.	Einfluß von Substanz P (SP) und IL6 auf die intrazelluläre Kalzium – Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )	47
4.2.	Regulation des Bradykinin 2 – Rezeptors (B2 – Rezeptor)	50
4.2.1.	Regulation des B2 – Rezeptors in Abhängigkeit von IL6	50
4.3.	Darstellung des Glykoprotein 130 (Gp 130) an DRG – Neuronen	54
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1.	Gp 130 – Expression und akute Effekte von IL6	57
5.2.	Langzeiteffekte von IL6 am Beispiel der NK1 – Rezeptorexpression	59
5.3.	Die Rolle der Mek-Kinase bei der Signaltransduktion von IL6	60
5.4.	Langzeiteffekte von IL6 am Beispiel der Bradykinin (B2) – Rezeptorexpression	62
<b>6.</b>	<b>Schlußfolgerungen</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>65</b>

**Lebenslauf**

**Danksagung**

**Eidesstattliche Erklärung**



## Zusammenfassung

Interleukin 6 (IL6) ist ein pleiotropes Zytokin, das bei Entzündungsprozessen im Gewebe vermehrt freigesetzt wird. IL6 kann auch im peripheren Nervensystem synthetisiert werden, und es gibt Hinweise darauf, daß IL6 eine wichtige Rolle in der Nozizeption und bei der Entwicklung der entzündungsbedingten Hyperalgesie spielt. So zeigen z.B. IL6 – Knockout – Mäuse eine reduzierte Hitzesensibilität, und sie entwickeln eine geringere Hyperalgesie bei einer Entzündung eines Gelenkes.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob das Zytokin IL6 über Wirkungen an Primärafferenzen selbst an der Entstehung von Schmerz und Hyperalgesie bei Entzündungen beteiligt sein könnte. Dazu wurden akute und langfristige Wirkungen von IL6 auf kultivierte Hinterwurzelganglienzellen (DRG – Neurone) der Ratte untersucht. Direkte Effekte von IL6 wurden mit Hilfe der Kalzium – Imaging – Methode (Fura-2) untersucht. Um langfristige Wirkungen zu ermitteln, haben wir untersucht, ob IL6 die Expression der nozizeptionsrelevanten Rezeptoren für Bradykinin (Bradykinin 2 – Rezeptor) und Substanz P (Neurokinin 1 – Rezeptor) in DRG – Neuronen beeinflusst. Die Expression dieser beiden Rezeptoren wurde deshalb untersucht, da in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, daß diese beiden Rezeptoren bei einer experimentellen Arthritis im Kniegelenk der Ratte an DRG – Neuronen sehr stark hochreguliert werden.

Aus allen Ebenen der Wirbelsäule der Ratte wurden die DRG's präpariert und die Neurone aus den Ganglien enzymatisch isoliert. Nach mechanischer Vereinzelung wurden die Neurone für 3 Tage kultiviert. Während der Kultivierung erfolgten Regulationsversuche mit IL6, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Indomethacin und einem Inhibitor der Mek-Kinase (1,4 Diamino-2,3 olicyano-1,4 bis[o-aminophenylmercapto]-butadiene). Nach entsprechenden immunhistochemischen Markierungen wurde die Expression des Neurokinin 1 (NK1) – und des Bradykinin 2 (B2) – Rezeptors an den Neuronen untersucht. Zudem wurde eine Komponente des IL6 – Rezeptorkomplexes, das Glykoprotein 130 (Gp 130), immunhistochemisch nachgewiesen. Bei weiteren Experimenten zur Verteilung des Gp 130 an den DRG – Neuronen konnte festgestellt werden, daß bei 18 % der Zellen das Gp 130 in der Zellmembran lokalisiert ist. Bei der Mehrzahl der Neurone ist Gp 130 zytosolisch lokalisiert.

Damit IL6 an einer Zelle wirken kann, muß ein IL6 – Rezeptorkomplex vorhanden sein, der aus IL6 selbst, dem IL6 – Rezeptor, der als lösliche oder membrangebundene Form existiert, und dem Gp 130 besteht. Wahrscheinlich

besitzen ein Drittel aller DRG – Neurone einen funktionell intakten Rezeptorkomplex für IL6. Dafür sprechen die Ergebnisse des Kalzium - Imaging, bei dem 33 % der Zellen mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) nach akuter Badapplikation von IL6 antworten. Während in der Normalkultur 10 % der Neurone den NK1 – Rezeptor exprimieren, waren nach Zugabe von IL6 30 % aller Neurone positiv für die NK1 - Rezeptormarkierung. Dies wurde in den Kalzium – Imaging – Versuchen auch funktionell bestätigt. Während ca. 10 % der Zellen der Normalkultur mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  als Antwort auf Substanz P reagieren, läßt sich ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  bei 30 % der Zellen nachweisen, die mit IL6 vorinkubiert waren. Auf die Regulation des B2 – Rezeptors besitzt IL6 keinen signifikant nachweisbaren Effekt.

Der Entzündungsmediator  $PGE_2$  besitzt ebenfalls einen regulativen Einfluß auf den NK1 – Rezeptor. Unter  $PGE_2$  – Einfluß exprimieren bis zu 40 % der Neurone den NK1 – Rezeptor. Durch die Untersuchung der Überstände der Neuronenkulturen mit Hilfe eines ELISA – Tests konnte ausgeschlossen werden, daß IL6 die Produktion von  $PGE_2$  an den Neuronen erhöht.

Die Signaltransduktion des IL6 verläuft hauptsächlich über zwei Signalkaskaden. Hier wurde der Signalweg untersucht, der über die Mek-Kinase – MAPK (mitogen activated protein kinase) – Kaskade verläuft, da Hinweise existieren, daß diese Kaskade von IL6 und  $PGE_2$  benutzt wird. Nach Zugabe von IL6 zusammen mit dem Mek-Kinase – Inhibitor zu den DRG – Neuronen blieb die IL6 – induzierte Hochregulation des NK1 – Rezeptors aus. Der Mek-Kinase – Inhibitor verhinderte ebenfalls die  $PGE_2$  – induzierte Hochregulation des NK1 – Rezeptors. Das spricht dafür, daß IL6 und  $PGE_2$  zur Regulation des NK1 – Rezeptors den Mek-Kinase – Weg benutzen.

Insgesamt zeigen die Daten dieser Arbeit, daß IL6 akute Effekte (Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ ) und langfristige Effekte (Hochregulation des NK1 – Rezeptors) an peripheren Neuronen auslösen kann. Der Nachweis der IL6 – Wirkung direkt an Neuronen macht es wahrscheinlich, daß die hyperalgetische Wirkung von IL6 zumindest teilweise über direkte neuronale Effekte zustande kommt. Die Beeinflussung dieser Mediatorwirkung stellt daher eine mögliche und interessante Option der Schmerzbekämpfung dar.

## 1. Einleitung

### 1.1. Rheumatismus

Unter dem Begriff "Rheumatismus" wird eine Vielzahl von Krankheitsbildern verstanden, die sich hauptsächlich am Bewegungsapparat manifestieren und dort zu Schmerzen und Funktionseinbußen führen. Der rheumatische Formenkreis wird grob in drei Bereiche eingeteilt. Ein Bereich umfaßt die degenerativen Gelenkerkrankungen (Arthrosen), die aufgrund eines unphysiologischen Knorpelabbaus entstehen. Zur zweiten Gruppe gehören die entzündlichen Rheumaformen (Arthritiden). Die dritte Gruppe stellt die extraartikulären Rheumaformen (z.B. Manifestationen an Haut und Gefäßen) dar (Siegenthaler et al. 1992).

#### 1.1.1. Die rheumatoide Arthritis

Bei der rheumatoiden Arthritis handelt es sich um eine chronische Entzündung der Synovialmembran. Daneben können extraartikuläre Manifestationen an der Haut (subkutane Rheumaknötchen), an der Muskulatur (Atrophie) und an den Gefäßen (Vaskulitis) festgestellt werden (Gross 2003). Der fortschreitende, selten durch Remissionen unterbrochene, destruierende Entzündungsprozeß manifestiert sich an zahlreichen Gelenken (Baenkler 2001). Neben Schwellung, Schmerz und Funktionseinbuße der betroffenen Gelenke führt der Entzündungsprozeß zur völligen Zerstörung der Gelenkstrukturen (Siegenthaler et al. 1992).

#### 1.1.2. Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Trotz intensiver Forschung sind die krankheitsauslösenden Ursachen der rheumatoiden Arthritis noch unzureichend verstanden. Vieles deutet jedoch darauf hin, daß bei gegebener genetischer Disposition ein oder mehrere exogene Antigene krankheitsauslösend sein können (Schneider 1997). Während sich in der Synovialis gesunder Gelenke keine lymphozytären Zellelemente finden lassen, zeigt die Synovialis bei Gelenken mit rheumatoider Arthritis eine Hyperplasie mit diffuser, lymphfollikelähnlicher Infiltration. Die Infiltrate bestehen hauptsächlich aus T – Zellen (Gross 2003). Der immungenetisch prädistinierte Wirtsorganismus reagiert nach der

Konfrontation mit dem arthritischen Agens mit einer Generierung entzündungspersistierender Mediatoren (Riede et al. 2004), deren Quelle zumeist die T - Zellen sind. Die pathogene Bedeutung der proinflammatorischen Mediatoren, z.B. von Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 8 (IL8) liegt u.a. in der Aufrechterhaltung der gelenkzerstörenden Wirkung von Proteasen (z.B. Matrixmetalloproteinasen), die aus Leukozyten, Synoviozyten und Chondrozyten freigesetzt werden (Riede et al. 2004). Zwei Hypothesen dominieren in der aktuellen Forschung zur Ätiologie der rheumatoiden Arthritis: Bei der „T – Zell – Hypothese“ stimuliert ein Autoantigen die T – Helfer – Zellen in der Synovialmembran. Die T - Zellen proliferieren, sezernieren Zytokine und lösen somit den destruierenden Entzündungsprozeß aus (Riede et al. 2004). Die „Synoviozytenhypothese“ dagegen sieht die T – Helfer – Zellen als Zellen, die den destruierenden Entzündungsprozeß unterhalten, aber nicht auslösen. Auslöser sollen hier die Synoviozyten sein, die selbst durch das primäre Autoantigen transformieren und autologe Peptide freisetzen. Diese Peptide werden dann durch die T – Helfer – Zellen präsentiert (Riede et al. 2004). Neben der Autoimmunreaktion als Ursache für die rheumatoide Arthritis werden unter anderem auch Traumen, metabolische und endokrinologische Faktoren diskutiert (Schneider 1997).

## 1.2. Schmerz

Während einer rheumatoiden Arthritis wird eine Schmerzempfindung durch Aktivierung des nozizeptiven Systems ausgelöst. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Ausbildung von Rezeptoren schmerzrelevanter Peptide im peripheren nozizeptiven System und deren Plastizität unter Einwirkung des Zytokins IL6 befaßt, sollen im Folgenden der Schmerzbegriff kurz charakterisiert werden und grundlegende periphere Mechanismen und Prozesse im nozizeptiven System beschrieben werden.

Nach der IASP – Definition ist Schmerz ein unangenehmes Sinnes- und Gefühls-erlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird (Schaible und Schmidt 1997).

Die Sinnesempfindung Schmerz folgt in der Regel auf Noxen (lat. Noxa = Schaden), die einen schädigenden Einfluß auf die Integrität oder Vitalität des Organismus ausüben. Werden aufgrund dessen die sensorischen Endigungen von Nozizeptoren

im gesunden Organismus erregt, spricht man vom physiologischen Nozizeptorschmerz. Die große Bedeutung liegt in seiner Signal- und Warnfunktion (Schaible und Schmidt 2000). Wird bei Entzündungen die Schmerzempfindung durch Anregung der Nozizeptoren ausgelöst, spricht man vom Nozizeptorschmerz bei pathophysiologischen Prozessen. Dies kann aufgrund der Sensibilisierung der Nozizeptoren (siehe 1.2.2.) zu Ruheschmerzen führen und eine chronische Schmerzempfindung auslösen. Der neuropathische Schmerz entsteht nach Schädigung oder Erkrankung von Neuronen des peripheren und zentralen nozizeptiven Systems (Schaible und Schmidt 2000).

Auch die Dauer des Schmerzerlebnisses kann als Grundlage der Charakterisierung genutzt werden. Es können somit akute, kurz anhaltende von chronischen, länger andauernden Schmerzen unterschieden werden. Im Allgemeinen wird ein Schmerz beim Menschen dann als chronisch angesehen, wenn die Beschwerden länger als ein halbes Jahr andauern (Schaible und Schmidt 1997).

Zur Schmerzempfindung tragen sensorische, affektive, vegetative und motorische Komponenten bei (Schaible und Schmidt 1997). Während die sensorische Komponente den noxischen vom nichtnoxischen Reiz diskriminiert, löst die affektive Komponente negative Emotionen aus, die das Wohlbefinden des Organismus stören können. Die vegetative Komponente umfaßt die physiologischen Begleiterscheinungen, die in Verbindung mit Schmerzen beobachtet werden können. Dazu zählen Hautrötung infolge erweiterter Blutgefäße, Anstieg der Herzfrequenz, des Blutdrucks und die Zunahme der Atemfrequenz. Mit der motorischen Komponente wird die Schutzfunktion für den Körper deutlich, da reflexbedingtes Verhalten die bedrohten Körperteile aus der Gefahrenzone bringt (Schaible und Schmidt 1997).

Es sind aber auch Situationen bekannt, bei denen noxische Reize (z.B. durch eine Gewebeschädigung ausgelöst) keinen Schmerz hervorrufen. Das kann bei einer allgemeinen Anästhesie der Fall sein. Daneben ist ebenfalls bekannt, daß Schmerz auch in Abwesenheit von noxischen Reizen oder ohne offensichtliche Aktivierung des nozizeptiven Systems auftreten kann (Schaible und Schmidt 2000, Schaible und Vanegas 2000).

### 1.2.1. Das nozizeptive System

Zum nozizeptiven System gehören Sensoren, die durch Noxen aktiviert werden (sogenannte Nozizeptoren) und die von ihnen aktivierten neuronalen Strukturen. Entsprechend bezeichnet man die Aufnahme, Weiterleitung und zentralnervöse Verarbeitung noxischer Signale als Nozizeption, um diese objektiven neuronalen Prozesse von der subjektiven Empfindung Schmerz deutlich abzugrenzen (Schaible und Schmidt 1997). Nozizeptoren kommen außer im Gehirn und dem Leberparenchym wahrscheinlich in allen Geweben und Organen vor (Meßlinger 1997).

Die meisten Nozizeptoren sind polymodal und reagieren auf mechanische (z.B. Druck, Stich), thermische (z.B. Hitze, Kälte) und chemische (z.B. Bradykinin, Prostaglandin) Reize. Sie enden als nichtkorpuskuläre, „freie“ Nervenendigungen im Gewebe, d.h. die Endigungen sind nicht von spezialisierten korpuskulären Strukturen eingehüllt (Schaible und Schmidt 1997). Im gesunden Organismus sind Nozizeptoren durch eine hohe Erregungsschwelle charakterisiert. Es sind auch stumme Nozizeptoren bekannt, die erst nach entsprechender Sensibilisierung (siehe 1.2.2.) erregbar werden. Histologisch kann man dünn myelinisierte, afferente Axone der Nozizeptoren (Gruppe III- oder  $A_{\delta}$ - Fasern) mit einer Leitungsgeschwindigkeit zwischen 2,5 und 20 m/s von nicht myelinisierten Axonen (Gruppe IV – oder C – Fasern) mit einer durchschnittlichen Leitungsgeschwindigkeit von 1 m/s unterscheiden, die als „freie“ unmyelinisierte Endigungen im peripheren Gewebe enden (Meßlinger 1997). C – Fasern sind zahlenmäßig häufiger vertreten als die Fasern der Gruppe III (Schaible und Schmidt 1997).

### 1.2.2. Sensibilisierung der Nozizeptoren

Wie unter 1.2.1. beschrieben, sind Nozizeptoren unter physiologischen Bedingungen nur durch starke und potentiell schädigende Reize aktivierbar. Nervenfasern aus den Gelenken enthalten viele  $A_{\delta}$  – und C – Fasern, die bei normalen Gelenkbewegungen im Arbeitsbereich nicht aktiviert werden. Die Muskel-, Sehnen- und Gelenknozizeptoren werden hingegen bei Zerrung am Bewegungsapparat und bei Torsion von Gelenken erregt (Handwerker 2000).

Bei einer Änderung des inneren Milieus, wie das bei einer Entzündung der Fall ist, kann durch Sensibilisierung der Nozizeptoren deren Reizschwelle deutlich ab-

gesenkt werden. Das führt zu einer Antwort des nozizeptiven Systems auf nicht-noxische Reize (z.B. Schmerz bei Berührung), was als Allodynie bezeichnet wird (Schaible und Schmidt 2000). Tritt durch Sensibilisierung eine verstärkte Schmerzempfindung bei noxischen Reizen auf, bezeichnet man das als Hyperalgesie (Schaible und Schmidt 2000).

Der als periphere Sensibilisierung bezeichnete Prozeß ist gekennzeichnet durch (Schaible und Schmidt 2000):

- Absenkung der Erregungsschwelle von polymodalen, peripheren Nozizeptoren für Reize
- Verstärkung der Antworten der peripheren Nozizeptoren auf überschwellige, noxische Reize
- Rekrutierung stummer Nozizeptoren
- Entstehung von „Spontanaktivität“ (Bildung von Aktionspotentialen ohne Reiz).

Bedeutung für die Sensibilisierung von Nozizeptoren im Entzündungszustand besitzen verschiedene Entzündungsmediatoren (z.B. Prostaglandine und Bradykinin), die auch im Falle der rheumatoiden Arthritis freigesetzt werden. An den sensorischen Endigungen der Nozizeptoren lassen sich für diese Mediatoren Rezeptoren darstellen, wobei aber nicht jedes Neuron alle Rezeptoren besitzt (Übersicht siehe Abb. 1). Die Entzündungsmediatoren wirken entweder direkt, indem sie Aktionspotentiale erzeugen, oder sie sensibilisieren die Neurone für andere Reize (Schaible und Schmidt 2000). So können auch sogenannte „stumme Nozizeptoren“ rekrutiert werden, die dann bei einer Entzündung im Gewebe durch mechanische und thermische Reize erregt werden können. Durch die Rekrutierung der „stummen Nozizeptoren“ wird der nozizeptive afferente Zustrom in das Zentralnervensystem verstärkt (Schaible und Schmidt 2000). Zu beachten ist, daß die Rezeptorexpression einer funktionellen Regelung unterliegt (Schaible und Schmidt 2000). So kann unter Entzündungsbedingungen eine erhöhte Expression des Bradykinin 1 (B1) – Rezeptors beobachtet werden, während unter normalen, krankheitsfreien Bedingungen nur eine Expression des Bradykinin 2 (B2) – Rezeptors beobachtet wird (Dray und Perkins 1993). Auch das Vorhandensein von Protonen, das bei Entzündungen immer beobachtet wird, unterstützt die Wirkung der Entzündungsmediatoren (Schaible und Schmidt 2000).

Wenn die Nozizeptoren durch periphere Sensibilisierung stärker erregt werden, kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Transmittern aus den synaptischen

Endigungen. Ausgeschüttet werden unter anderem Glutamat und Neuropeptide (z.B. Substanz P) (Schaible und Schmidt 2000). Während diese Neuropeptide im Rückenmark nur bei noxischen Reizen freigesetzt werden, setzen sensibilisierte Neurone diese Neuropeptide schon bei nichtnoxischen Reizen frei (Schaible und Grubb 1993). Dieser präsynaptische Mechanismus der zentralen Sensibilisierung spielt vor allem beim entzündungsbedingten Nozizeptorschmerz eine Rolle (Schaible und Schmidt 2000). Kennzeichen dieser zentralen Sensibilisierung sind (Schaible und Schmidt 2000):

- Absenkung der Erregungsschwelle der Rückenmarkszelle bei Reizung des entzündeten Gewebes
- Verstärkung der Antwort der Rückenmarkszelle auf überschwellige Reizung des entzündeten Gewebes
- Verstärkung der Spontanaktivität
- Verstärkung der Antwort bei Reizung von gesundem Gewebe, das an das entzündete Gewebe angrenzt (Expansion des rezeptiven Feldes).

### 1.2.3. Die neurogene Entzündung

Werden Nozizeptoren durch Reize erregt, kann eine Vasodilatation oder eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität in dem von diesen Fasern innervierten Gebiet hervorgerufen werden. Da diese Effekte deutliche Entzündungszeichen sind und sie von neuronalen Strukturen ausgelöst werden, spricht man von der neurogenen Entzündung (Schaible und Schmidt 2000). Die beschriebene Effektauslösung ist möglich, da aktivierte, primär afferente Nozizeptoren Neuropeptide wie z.B. Substanz P (SP) oder Calcitonin gene-related peptide (CGRP) synthetisieren und sie aus ihren peripheren Endigungen freisetzen können (Übersicht siehe Abb. 1). SP verursacht in der Peripherie eine Plasmaextravasation, CGRP ist ein starker Vasodilatator. Beide Mediatoren wirken entweder direkt an den Gefäßrezeptoren oder aktivieren benachbarte Zellen, die gefäßwirksame Substanzen freisetzen (Schaible und Schmidt 2000). Sie tragen so als neurogene Komponente zur entzündungsbedingten Gefäßreaktion und zur Sensibilisierung von Nozizeptoren und damit zur Schmerzentstehung bei (Schaible und Grubb 1993).



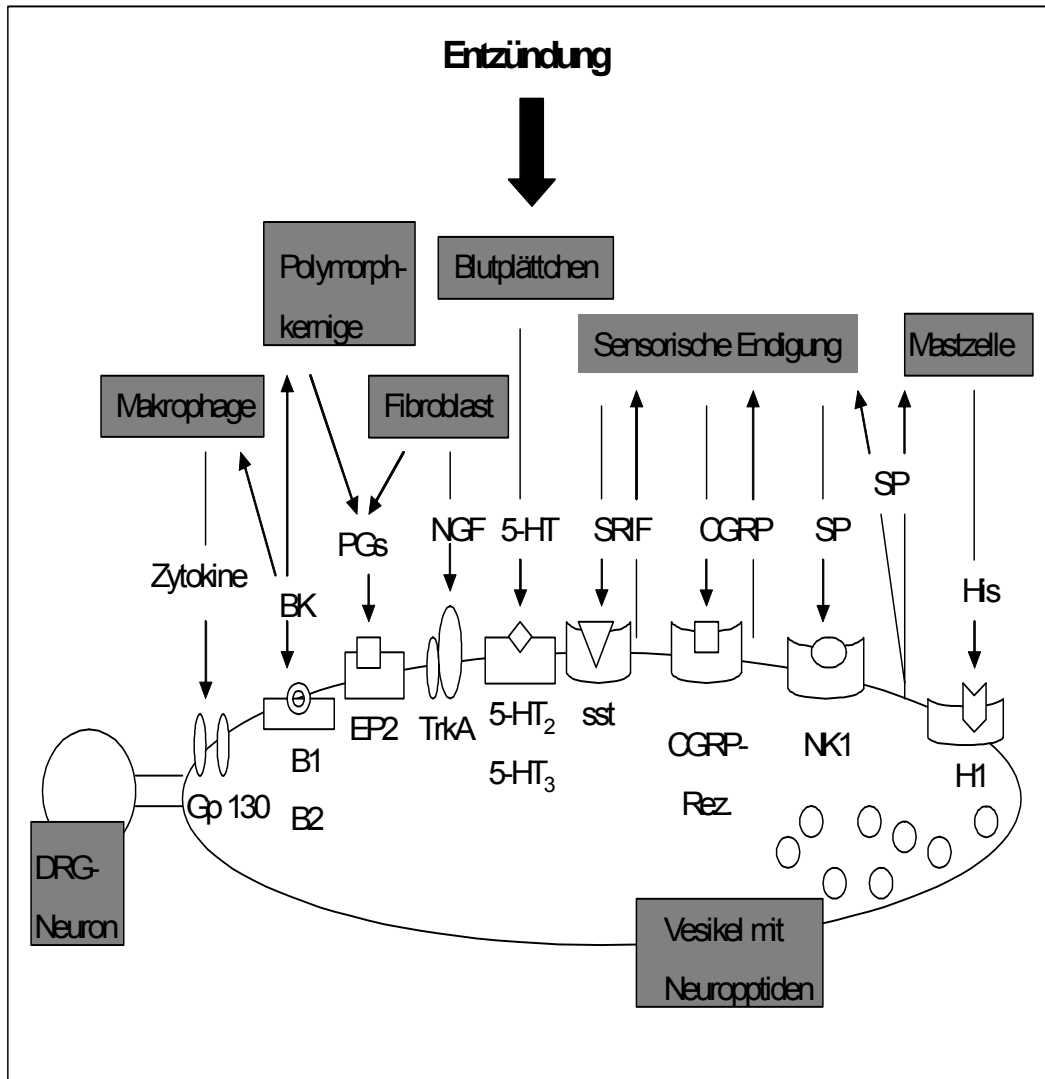


Abb. 1: Modell einer nozizeptiven Primärafferenz mit ihrem Zellkörper und einer sensorischen Endigung

Dargestellt sind Rezeptoren für Entzündungsmediatoren und Neuropeptide. Diese werden aus verschiedenen Zellen während einer Entzündung freigesetzt und wirken auf die Rezeptoren in der sensorischen Endigung. Zu berücksichtigen ist, daß nicht alle Rezeptoren auf einer sensorischen Endigung zu finden sind. Die Endigung selbst setzt ebenfalls Neuropeptide frei, die exzitatorische oder inhibitorische Wirkung innerhalb des Entzündungsgeschehens haben.

Gp 130 Glykoprotein 130, BK Bradykinin, B1 Bradykinin 1 – Rezeptor, B2 Bradykinin 2 – Rezeptor, PGs Prostaglandine, EP2 Rezeptor für Prostaglandin E<sub>2</sub>, NGF Nerve growth factor, TrkA Tyrosinkinase A – Rezeptor, 5-HT 5-Hydroxytryptamin, 5-HT<sub>2</sub> Serotonin-2 – Rezeptor, 5-HT<sub>3</sub> Serotonin-3 – Rezeptor, SRIF Somatostatin, sst Somatostatin – Rezeptor, CGRP Calcitonin gene-related peptide, CGRP-Rez. Rezeptor für Calcitonin gene-related peptide, SP Substanz P, NK1 Neurokinin 1 – Rezeptor, His Histamin, H1 Histamin 1 – Rezeptor, DRG-Neuron Dorsal root ganglion-Neuron (Hinterwurzelganglien-Neuron), (nach Schaible und Schmidt 2000).

#### 1.2.4. Neurone der Hinterwurzelganglien (DRG – Neurone) adulter Ratten als Modell für den peripheren Nozizeptor

Die Zellkörper der Nozizeptoren des Körpers sind in paarigen Hinterwurzelganglien zusammengefaßt, welche entlang der Wirbelsäule liegen. Sie werden als Hinterwurzelganglienzellen oder Spinalganglienzellen bezeichnet.

Das Studium molekularer Prozesse direkt an den peripheren Endigungen ist erschwert, da die Nozizeptoren sehr feine Endbäumchen ( $\varnothing$  1  $\mu$ m) besitzen. Um Untersuchungen nozizeptiver Prozesse an der Haut durchzuführen, steht als etabliertes Modell ein Haut – Nerven – Präparat zur Verfügung (siehe bei Kress et al. 1999). Da für tiefere Gewebe kein vergleichbares Modell wie bei Kress et al. (1999) zur Verfügung steht, werden in der vorliegenden Arbeit isolierte Zellkörper von DRG's verwandt, um molekulare Veränderungen auf Rezeptorebene im nozizeptiven System untersuchen zu können. Für die Verwendung der isolierten DRG – Neurone als Modell zur *in vitro* - Untersuchung der Rezeptorexpression tieferer Gewebe sprechen mehrere Gründe:

Die Zellkörper der Neurone exprimieren an der Zellmembran Ionenkanäle, die auch an sensorischen Endigungen präsent sind. So werden Ionenkanäle beschrieben, die durch Noxen (z.B. Hitze) stimuliert werden (Cesare et al. 1999, Waxman et al. 1999). Die Zellkörper der DRG – Neurone exprimieren desweiteren Rezeptoren an der Zellmembran, an denen Liganden binden, die in Präparationen *in vitro* und *in vivo* sensorische Endigungen aktivieren. Beispielhaft können hier der Rezeptor VR1 für Capsaicin und der B2 – Rezeptor für Bradykinin genannt werden (Gold et al. 1996, Kress et al. 1997).

Weiterhin werden Mediatoren aus den Zellkörpern der DRG – Neurone freigesetzt, wie das aus primär afferenten Fasern und aus sensorischen Endigungen bekannt ist (Hingtgen und Vasko 1994, Vasko et al. 1994).

Daher kann angenommen werden, daß die Rezeptorexpression an den Zellkörpern der DRG – Neurone die Verhältnisse an den sensorischen Endigungen der DRG – Neurone widerspiegelt (Segond von Banchet et al. 2000). Da es sich bei den Untersuchungen zur Rezeptorexpression an DRG – Neuronen um Zellkulturen handelt, sind die Ergebnisse immer als Ergebnisse von *in vitro* - Studien zu betrachten, die in *in vivo* – Ansätzen in ihrer Bedeutung erneut überprüft werden müssen.

### 1.3. Die Antigen – induzierte Arthritis (AIA)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß von IL6 auf die Expression des NK1 – Rezeptors und des B2 – Rezeptors an DRG – Neuronen der Ratte (siehe 1.7.). Die Grundlage für diese Fragestellung bildet die Studie von Segond von Banchet et al. 2000, die unter anderem die Plastizität dieser beiden Rezeptoren zeigt. Die AIA ist dem Krankheitsbild und –verlauf der rheumatoiden Arthritis (siehe 1.1.1.) des Menschen sehr ähnlich und ist ein Modell für eine durch das Immunsystem getragene Gelenkentzündung. Die Gelenkentzündung ist durch Injektion eines Fremdanigens (z.B. methyliertes Rinderserum – Albumin in kompletten Freund'schen Adjuvans) in das Gelenk ausgelöst worden. Die Tiere zeigen im Schmerzverhalten vom 1.-29. Tag Zeichen einer Hyperalgesie im betroffenen Knie.

Bei den Untersuchungen zur Rezeptorexpression an lumbalen DRG – Neuronen kann folgendes festgestellt werden: Während der akuten Phase der AIA wird ipsi- und kontralateral eine vermehrte Expression des NK1 – Rezeptors an lumbalen DRG – Neuronen beobachtet. Der NK1 – Rezeptor wird in bis zu 50 % (versus 10 % unter normalen Bedingungen) der Neurone exprimiert. In der chronischen Phase der AIA nimmt die NK1 – Rezeptorexpression ab. Überraschenderweise zeigt diese Studie, daß der B2 – Rezeptor, nicht der B1 – Rezeptor, der sonst unter Entzündungsbedingungen hochreguliert wird, beidseits vermehrt exprimiert ist.

### 1.4. Der NK1 - Rezeptor

Wie unter 1.3. beschrieben, wird während der akuten Phase der AIA der NK1 – Rezeptor für SP stark hochreguliert (Segond von Banchet et al. 2000). Im gesunden Organismus ist dieser Rezeptor in circa 10 % der primär afferenten Neurone exprimiert (Segond von Banchet et al. 2000). Bei diesen Neuronen handelt es sich in den meisten Fällen um nozizeptive Neurone mit hoher Schmerzschwelle, da alle DRG – Neurone mit dem NK1 – Rezeptor auf Capsaicin antworten (Breckenmacher et al. 1998) und Neuropeptide produzieren, zum Teil auch SP (Segond von Banchet und Schaible 1999). Die Bindung von SP an den NK1 – Rezeptor induziert in DRG – Neuronen einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Breckenmacher et al. 1998, Segond von Banchet et al. 2003) und depolarisiert diese Neurone (Szucs et

al. 1999). SP wird in den Perikaryen von primär afferenten Neuronen mit dünn myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern synthetisiert und bei Aktivierung der Fasern aus den peripheren und zentralen Endigungen freigesetzt.

### 1.5. Der B2 – Rezeptor

Der B2 – Rezeptor für Bradykinin bleibt während der akuten und chronischen Phase einer AIA über Wochen hochreguliert (siehe 1.3.) (Segond von Banchet et al. 2000). Dieser Rezeptor ist bei der Nozizeption von großer Bedeutung, da Bradykinin unter *in vitro* und *in vivo* – Bedingungen über den G – Protein – gekoppelten B2 – Rezeptor eine beträchtliche Anzahl von Nozizeptoren erregt und/oder sensibilisiert (Kress und Reeh 1996). Die peripheren Neurone werden durch Anwesenheit des Bradykinin hauptsächlich für mechanische Reize und Hitze sensibilisiert.

Bradykinin ist ein basisches Peptid mit potenter algetischer Wirkung, welches unter Entzündungsbedingungen in das Plasma freigesetzt wird. Es wird aus dem Precursorprotein Kininogen durch Argininesterasen (Kallikreine) hergestellt (Löffler und Petrides 1998). Bradykinin verursacht u.a. die Kontraktion glatter Muskeln, erhöht die Gefäßpermeabilität und fördert die Vasodilatation, was die Wirkung anderer Entzündungsmediatoren unterstützt. Bradykinin bindet unter normalen Bedingungen eher an den B2 – Rezeptor, im Entzündungsfall eher an den B1 – Rezeptor, der unter diesen Bedingungen vermehrt exprimiert wird (Dray und Perkins 1993).

### 1.6. Die Regulation des NK 1 – und des B2 – Rezeptors durch Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

Neben Thromboxanen und Leukotrienen zählen die Prostaglandine zur großen Gruppe der Eikosanoide, die als Derivate der Arachidonsäure anzusehen sind.

Prostaglandine existieren in den verschiedenen Subtypen Prostaglandin E<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> und F<sub>2α</sub>, die sich in der Position der Hydroxyl – und Ketogruppen unterscheiden (Löffler und Petrides 1998).

Das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> spaltet aus Arachidonsäure Arachidonat ab. Aus diesem wird durch die Cyclooxygenase (COX), die in zwei Isoformen (COX 1 und COX 2) existiert, in einem sauerstoffabhängigen Prozeß Prostaglandin H<sub>2</sub>

abgespalten. Es stellt die Muttersubstanz der Prostaglandintypen und des Thromboxan A<sub>2</sub> dar (Löffler und Petrides 1998). Insbesondere PGE<sub>2</sub> spielt eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion, indem es zur Sensibilisierung der Neurone (siehe 1.2.2.) beiträgt und damit eine Hyperalgesie und Allodynie vermittelt. Besonders deutlich wird dies, indem durch gezielte Inhibition bestimmter Enzyme eine Schmerzempfindung ausbleibt, wie das z.B. durch Hemmung der Cyclooxygenase infolge von Aspirin oder Indomethacin geschieht. Beide Medikamente sind kompetitive Inhibitoren, da sie mit Arachidonat um den Bindungsplatz der Cyclooxygenase konkurrieren (Löffler und Petrides 1998). Auch konnte der Rezeptor des PGE<sub>2</sub> an kleinen DRG – Neuronen lokalisiert werden. Hierin spiegelt sich vermutlich die durch PGE<sub>2</sub> vermittelte Hyperalgesie wider (Bär et al. 2004).

Eine aktuelle Studie (Segond von Banchet et al. 2003) zeigt, daß unter PGE<sub>2</sub> – Einfluß die Gruppe der kultivierten DRG – Neurone signifikant erhöht wird, die den NK1 – Rezeptor exprimiert (von 10 % basal auf 40 – 50 % erhöht). Vermittelt wird die Hochregulation des NK1 – Rezeptors durch PGE<sub>2</sub> über die Adenylatzyklase, die vermehrt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt. Dadurch wird das Enzym Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Eine Blockade der PKA verhindert die durch PGE<sub>2</sub> induzierte Hochregulation des NK1 – Rezeptors (Segond von Banchet et al. 2003).

#### 1.7. Einfluß von IL6 auf die NK1 – und B2 - Rezeptorexpression

Um die beschriebenen Veränderungen auf Rezeptorebene bei AIA verstehen zu können, muß nach Mediatoren gesucht werden, die im Entzündungsfall freigesetzt werden und die die Transkription im Zellkern beeinflussen können und so zu einer erhöhten Expression der Rezeptoren führen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung des IL6 auf die Expression des NK1 – und B2 – Rezeptors untersucht, da Hinweise existieren, die einen regulativen Einfluß auf die Rezeptoren vermuten lassen. So wird bei unilateral ausgelöster AIA, bei der eine symmetrische Rezeptorexpression an den DRG – Neuronen der Segmente L1 – L5 uni – und kontralateral beobachtet wird, auf der kontralateralen Seite neben einem Anstieg von SP und CGRP (Malcangio et al. 1999) auch eine erhöhte Konzentration an IL6 beobachtet (Mentzel et al. 1998). Weiterhin weisen verschiedene *in vivo* -

Studien darauf hin, daß ein Zusammenhang zwischen IL6 – Einfluß und Schmerzempfindung besteht, was auch an molekularen Veränderungen auf Rezeptorebene deutlich wird. So wird nachgewiesen, daß IL6 in Zusammenhang mit seinem löslichen Rezeptor *in vivo* die Sensibilisierung von Hitze - Nozizeptoren der Haut von Ratten hervorruft. Zusätzlich kann ein Anstieg der CGRP – Freisetzung beobachtet werden, was ebenfalls auf eine Sensibilisierung von Nozizeptoren hindeutet und damit zur Schmerzempfindung beiträgt (Oprée und Kress 2000, Obreja et al. 2001).

#### 1.7.1. Struktur von IL6

Das Polypeptid IL6 besteht aus 184 Aminosäuren, das aus einem Vorläufermolekül mit 212 Aminosäuren synthetisiert wird (Struktur siehe Abb. 2). IL6 wird durch posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung) so modifiziert, daß unterschiedliche Moleküle mit einer Masse von 21,5 – 28 kDa entstehen (Klein 1991). IL6 bildet zusammen mit Interleukin 11 (IL11), “leukemia inhibiting factor” (LIF), Oncostatin M (OSM), “ciliary neurotrophic factor” (CNTF), “cardiotrophin-like cytokin” (CLC) und Cardiotrophin 1 (CT1) die Gruppe der Zytokinfamilie vom IL6 - Typ (Heinrich et al. 2003). Sie besitzen eine ähnliche Quartärstruktur mit vier antiparallelen Helices (Helix A-D). IL6 und IL11 haben einen identischen Aufbau mit vier geraden Helixverläufen. Bei den anderen Mitgliedern der Zytokinfamilie ist eine Helix abgelenkt. Das hat Konsequenzen auf die unterschiedliche Dimerisierung des Glykoproteins 130 (Gp 130), dessen Nutzung in der Signaltransduktion der gesamten Zytokinfamilie vom IL6 – Typ eine weitere Gemeinsamkeit darstellt (Heinrich et al. 2003).

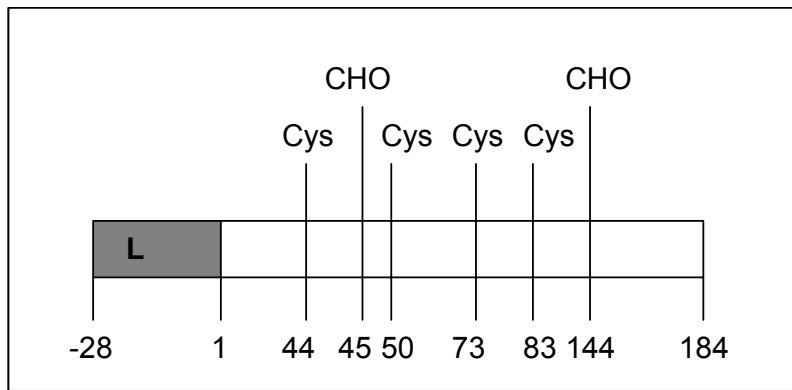


Abb. 2.: Organisation des humanen IL6-Polypeptids

Das Gen weist signifikante Sequenzhomologien auf. Die Zahlen benennen die Aminosäurerestpositionen. Das Leaderprotein (L) wird durch Splicing abgetrennt. Cys Cystein, CHO Kohlenhydratseitenkette, L Leaderprotein (nach Klein 1991)

### 1.7.2. Expression von IL6

Die Hauptquellen der Synthese von IL6 sind Fibroblasten, Makrophagen, Monozyten und aktivierte T-Zellen (Klein 1991). Die Synthese wird durch verschiedene Signale reguliert. Viren oder Lipopolysaccharide von Bakterien induzieren die IL6 – Syntheserate in Fibroblasten und in Monozyten (Helfgott et al. 1987). Diverse Zytokine wie TNF $\alpha$ , Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) und Interleukin 1 (IL1) bewirken ebenfalls eine Synthesesteigerung in anderen Zellen (z.B. IL6 – Produktion in Hepatozyten ausgelöst durch IL1). Eine Verminderung der IL6 – Synthese kann z.B. durch die antiinflammatorische Wirkung von Somatostatin erreicht werden (Grimaldi et al. 1997). Während Entzündungen, Traumen, Autoimmunerkrankungen oder Tumorerkrankungen kann eine erhöhte IL6 – Sekretion festgestellt werden (Obreja et al. 2001).

### 1.7.3. Funktion von IL6

Vielfältige Funktionen können IL6 als pleiotropes Zytokin zugeordnet werden. So kommt IL6 eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort zu (Zhong et al. 1999), wie z.B. die Differenzierung von B – Zellen und die Synthese von zytotoxischen T – Zellen (siehe Abb. 3). Ebenfalls wird die Hämatopoese durch IL6 beeinflusst. Die Wirkung von Interleukin 3 (IL3) und IL6 auf die Proliferation von hämatopoetischen

Vorläuferzellen (Koike et al. 1988) und auf die Akute – Phase Reaktion bei Fieber ist bekannt.

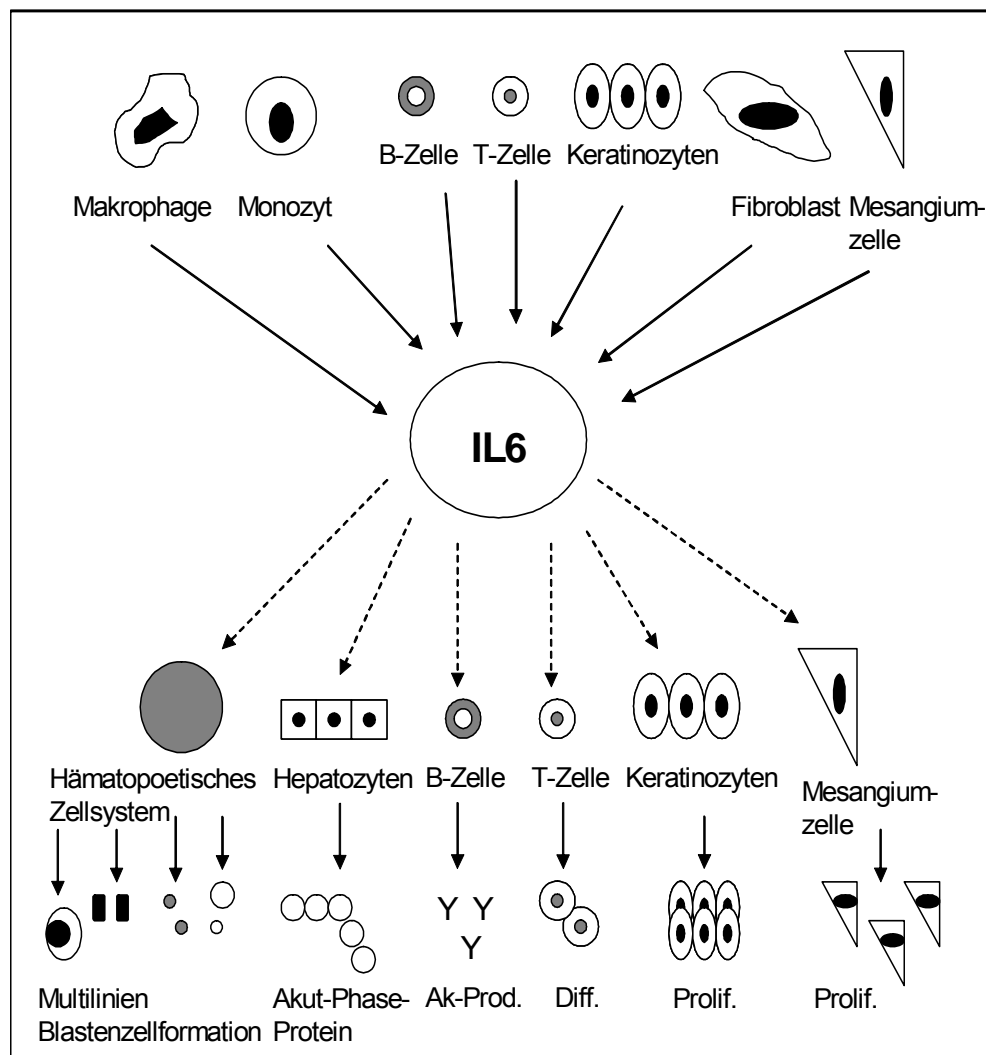


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zellen, die als Hauptsekretionsort von IL6 bekannt sind und der Hauptfunktionen, die IL6 ausübt

IL6 wird von Makrophagen, Monozyten, B – und T – Zellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Mesangiumzellen sezerniert. Weiterhin besitzt IL6 vielfältige biologische Funktionen auf die dargestellten Zielzellen, nämlich Zellen des hämatopoetischen Systems, auf Hepatozyten, B – und T – Zellen, Keratinozyten sowie Mesangiumzellen. Ak-Prod. Antikörperproduktion, Diff. Differenzierung, Prolif. Proliferation (nach Naka et al. 2002)



#### 1.7.4. Signaltransduktion von IL6

Zum IL6 – Rezeptorkomplex gehören der IL6 – Rezeptor, der als lösliche oder membrangebundene Form existiert, IL6 selbst und das Gp 130. Die Bindung von IL6 an seinen Rezeptor führt zur Assoziation des Gp 130, das ebenfalls als membrangebundene oder lösliche Form im Zytoplasma existiert. Das Gp 130 wird, wie schon erwähnt, von der gesamten Zytokinfamilie vom IL6 - Typ genutzt (Heinrich et al. 2003). Jeweils der membrangebundene und der lösliche IL6 – Rezeptor binden ihren Liganden mit gleicher Affinität (Rose-John und Heinrich 1994). Die Bindung von IL6 an den Rezeptor löst die Dimerisierung des in monomerer Form vorliegenden Rezeptors aus (siehe Abb. 4A). Gleichzeitig wird so die Assoziation von tyrosinspezifischen Proteinkinasen, die sogenannten Januskinasen (Jaks) angeregt (Heinrich et al. 2003). Es sind die vier Subtypen Jak 1, Jak 2, Jak 3 und Tyk 2 bekannt, die unterschiedlichen Einfluß auf die Signaltransduktion haben. So ist Jak 1 besonders stark in die Signaltransduktion involviert (Heinrich et al. 2003). Die Jaks phosphorylieren sich selbst und die Tyrosylreste des Rezeptors. Über SH<sub>2</sub>- Domänen binden Transkriptionsfaktoren, die als “signal transducers and activators of transcription” (STAT`s) bezeichnet werden (Löffler und Petrides, 1998). Diese werden wiederum durch die gebundenen Jaks phosphoryliert und erhalten so die Fähigkeit zur Dimerisierung und zur Passage in den Zellkern. Dort können sie die Transkription verschiedener Gene aktivieren (siehe Abb. 4B).

In einer zweiten Kaskade bindet an den phosphorylierten Rezeptorkomplex über SH<sub>2</sub> – Domänen das Adapterprotein Grb 2. Dieses bindet das Protein “son of sevenless” (SOS), welches am in der Membran integrierten Ras-Protein zu einem Austausch von Cytidindiphosphat (GDP) zu Cytidintriphosphat (GTP) führt. GTP-Ras ist ein Aktivator der Proteinkinase Raf, die das erste Glied in der folgenden Proteinkaskade darstellt. Danach werden die Mek (mitogen activated protein kinase) – Kinase und die Erk (extracellulär regulated signal kinase) – Kinase aktiviert (Heinrich et al. 2003). Das letzte Ziel ist wiederum die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die zur Passage in den Zellkern fähig sind (siehe Abb. 4B).

Infolge des negativen Feedbacks durch das Protein “supressor of cytokine signaling” (SOCS) und das “protein of activated STAT” (PIAS) wird die Transkriptionsaktivierung gestoppt, wobei der genaue Mechanismus allerdings noch nicht vollständig geklärt ist (Heinrich et al. 2003).

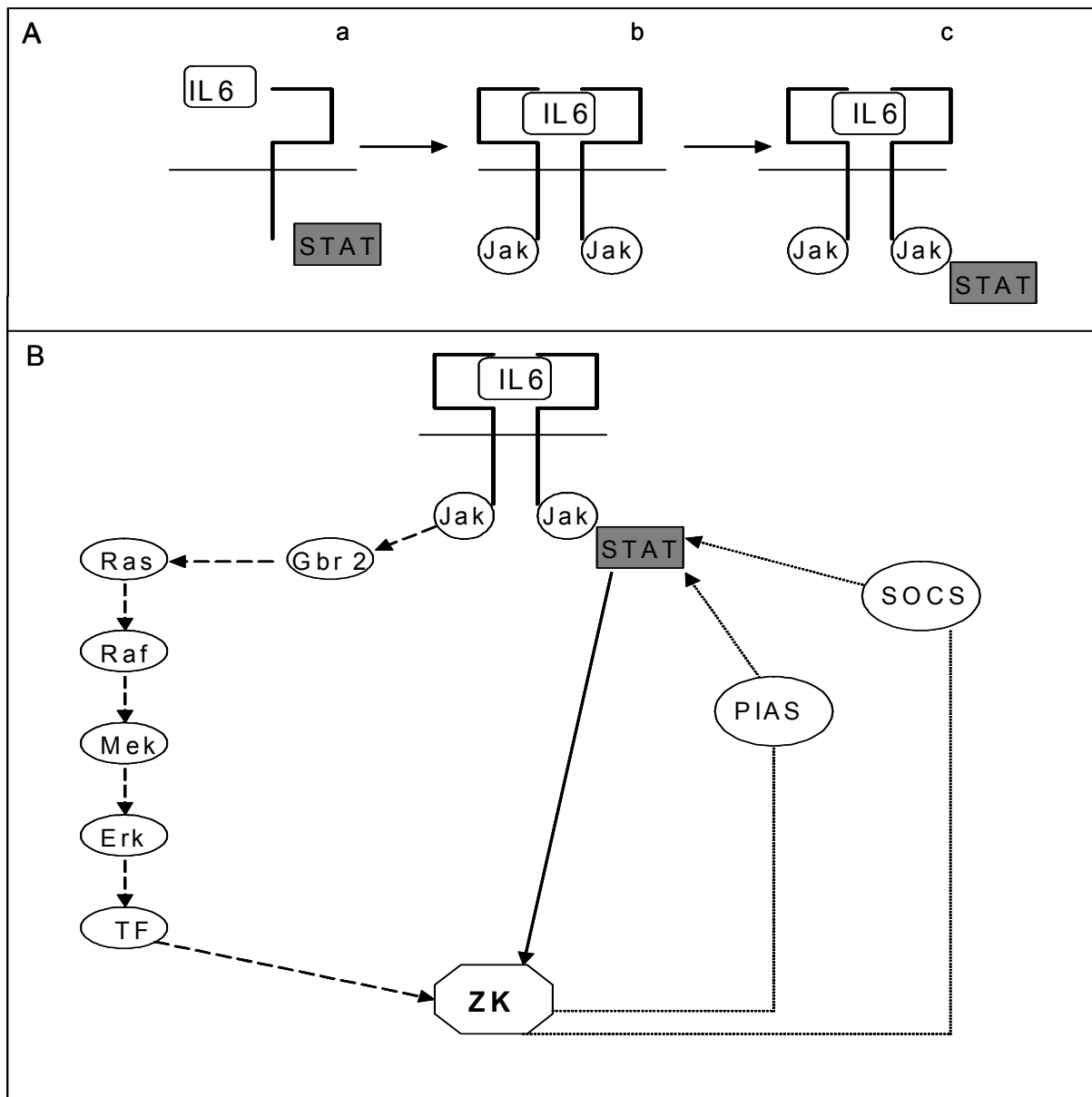


Abb. 4.: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges von IL6

4A stellt die Zusammenlagerung des IL6 – Rezeptorkomplexes dar. In 4A-a liegt der IL6-Rezeptor in monomerer Form vor. Die Bindung von IL6 in 4A-b führt zu Rezeptordimerisierung und Anlagerung der JAKs, was zu Phosphorylierung und Anlagerung der STAT's in 4A-c führt.

4B zeigt nach Bildung des IL6-Rezeptorkomplexes die zwei bekannten Kaskaden, die zur Änderung der Transkription im Zellkern führen können (Beschreibung im Text 1.7.4.).

IL6 Interleukin 6, JAK Januskinase, STAT Transkriptionsfaktor (signal transduction and activators of transcription), Grb2 Adaptorprotein, Ras Protein mit GTP-ase Aktivität, Raf Proteinkinase, Mek Kinase (mitogen activated protein), Erk Kinase (extracellulär signal regulated kinase), TF Transkriptionsfaktoren, ZK Zellkern, SOCS negatives Feedback (supressor of cytokine signal), PIAS protein of activated STAT

## 2. Zielstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß Interleukin 6 (IL6) auf die Plastizität von Rezeptoren schmerzrelevanter Peptide ausübt. Dazu sollten kurzzeitige und langfristige Einflüsse untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von IL6 auf die Expression des Neurokinin 1 (NK1) – Rezeptors und des Bradykinin 2 (B2) – Rezeptors untersucht. Die entsprechenden Rezeptoren wurden an kultivierten DRG – Neuronen adulter Ratten mit immunhistochemischen Methoden markiert und deren Expression erfaßt und ausgewertet. Unterschiede in der Expression der Rezeptoren bei An- und Abwesenheit von IL6 sollten in verschiedenen Kulturansätzen dargestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Signaltransduktionsweg von IL6 bei benannten Wirkungen untersucht werden. So wurde unter Einfluß von IL6 eine im Signalweg zentrale Kinase (Mek-Kinase) durch einen Inhibitor blockiert. Die Expression des NK1 – Rezeptors konnte dann mit der bei alleiniger Wirkung von IL6 gefundenen Expression verglichen werden. So waren Rückschlüsse auf den Signalweg des IL6 möglich.

Es ist bekannt, daß Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) einen regulativen Einfluß auf die Expression des NK1 – Rezeptors hat (siehe 1.6.). Um Interaktionen der Mediatoren IL6 und PGE<sub>2</sub> in ihrem Signaltransduktionsweg aufzudecken, sollte drittens mittels NK1 – Markierung der Effekt des Inhibitors der Mek-Kinase auf die Wirkung von PGE<sub>2</sub> überprüft werden.

Da IL6 als Entzündungsmediator in diesem pathophysiologischen Zustand freigesetzt wird, sollte in einem vierten Ansatz geklärt werden, ob die beobachteten Effekte auf den NK1 – Rezeptor direkt durch IL6 ausgelöst wurden oder ob die Wirkung möglicherweise indirekte Folge einer von IL6 ausgelösten, erhöhten PGE<sub>2</sub> – Synthese war. Dazu wurde der Überstand der DRG – Neuronenkulturen mittels ELISA untersucht und der Gehalt an PGE<sub>2</sub> bestimmt.

Um die quantitativen Ergebnisse der NK1 – Regulierung funktionell zu verifizieren und kurzfristige Effekte von IL6 auf die Neurone darzustellen, wurden Kalzium - Imaging – Versuche durchgeführt. Dabei wurde erstens untersucht, wie viele Neurone nach IL6 – Zugabe mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-

konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  antworteten und zweitens, ob mehr Neurone eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach SP – Zugabe zeigten, wenn sie mit IL6 vorinkubiert wurden.

Abschließend sollte das Glykoprotein 130 (Gp 130) mit immunhistochemischen Methoden dargestellt werden. Dieses Glykoprotein wird im Signalweg der gesamten Zytokinfamilie vom IL6 – Typ rekrutiert.

Ziel der Untersuchungen über die Wirkung von IL6 sollte weiterhin sein, die wenig verstandene Interaktion zwischen Immunsystem und Schmerzsystem besser darstellen zu können. Diese in der Grundlagenforschung erhaltenen Ergebnisse können in der Therapie chronischer Schmerzzustände klinisch angewendet werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Versuchstiere

Es wurden männliche, ca. 60 Tage alte und 250 g schwere Tiere vom Stamm Wistar für die Studien verwendet. Dabei handelte es sich um aus der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) in Gefangenschaft gezüchtete Albinoratten. Sie wurden 1913-1919 im Rahmen von Inzestversuchen im „Wistar Institute of Anatomy and Biology“ der „University of Pennsylvania“ in Philadelphia herausgezüchtet. Der gezüchtete Stamm war ein Auszuchtstamm. Zu den Zuchtbedingungen gehörten die Fütterung nach einer Standard Diät, ein Gesundheitsüberwachungsprogramm, keine medikamentöse Behandlung, keine Fremdblutzuführung sowie ein künstlicher Tag - Nachtrhythmus. So konnten standardisierte Bedingungen für alle Tiere gewährleistet werden.

#### 3.2. Vorbereitung der Präparation

##### 3.2.1. Vorbereitung des Nährmediums Ham's F12 + Nährmedium

Ham's F12 + Nährmedium wurde zur Suspension der Neurone und zur täglichen Fütterung der Zellen im Inkubator benötigt. Für 40 ml Medium wurden unter sterilen Bedingungen 4 ml Pferdeserum (10 %), 400 µl Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), 400 µl NGF (100 ng/ml, 7S recombinant mouse) und 200 µl Glutamin (1 mM) aliquotiert und mit Ham's F12 (Firma Sigma) auf 40 ml aufgefüllt.

##### 3.2.2. Vorbereitung der Deckgläschen

Mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen wurden zur Kultivierung der Neurone im Nährmedium im Inkubator benötigt, da Neurone an Luft auf einer Glasoberfläche nicht anwachsen können. Poly-L-Lysin bildet an Luft eine entsprechende Matrix aus, an der die Neurone wachsen konnten. Die Deckgläschen (d=13 mm) wurden mit Ethanol (70 %) und Salzsäure (HCl, 1M) entfettet, mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gespült und mit doppeldestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) autoklaviert. Anschließend wurden die Gläschen auf Filterpapier unter sterilen Bedingungen ausgelegt und an Luft, dann in der blauen Gasflamme restlos getrocknet. Danach erfolgte die Beschichtung der Deckgläschen

mit jeweils 35 µl Poly-L-Lysin (50 µg/ml) in der sterilen Werkbank. Nach mindestens 5 Stunden Trocknung bei Raumtemperatur wurde das überflüssige Beschichtungsmaterial durch eine dreifache Waschung in steriler, phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (sterile PBS) entfernt. Dann wurden die Deckgläschen erneut zum Trocknen auf Filterpapier ausgelegt. Je nach Nutzung wurden die beschichteten Deckgläschen in Petrischalen (d=35 mm) oder in Mikroplatten mit 12 Gefäßen (d=22 mm) umgelagert.

### 3.2.3. Vorbereitung der Tiere

Um die Versuchstiere an das Umfeld des Labors zu gewöhnen und so die Streßbelastung der Tiere am Tag der Präparation zu minimieren, wurden sie einen Tag zuvor aus dem Tierstall in das Labor gebracht. Dort wurden die Tiere ebenfalls in einem tiergerechten Käfig mit ausreichender Wasser- und Nahrungsversorgung gehalten.

## 3.3. Präparation der Hinterwurzelganglien (DRG)

### 3.3.1. Präparation der Wistar-Ratte

Das Tier wurde mit Dimethylether getötet. Der Tod des Tieres konnte durch fehlende Atmung, fehlenden Pulsschlag, Pupillentrübung und fehlende Reflexe auf schmerzhafte Reize festgestellt werden. Nach Eintreten des Todes wurde der Rücken des Tieres rasiert. Es folgte die Reinigung mit Ethanol (70 %). Die Haut über der Wirbelsäule des Tieres wurde mit einer spitzen Schere durchgeschnitten und entfernt. Dorsal gelegenes Fett wurde abpräpariert. Lateral der Wirbelsäule wurden mit einem Skalpell und einer spitzen Schere die Muskelansätze und Rippenansätze von kaudal nach cranial durchtrennt. Nach cranial und kaudal gelegten, horizontal verlaufenden Schnitten konnte die Wirbelsäule in toto entfernt werden. Ventral gelegene Gefäße wurden abpräpariert. Die Wirbelsäule wurde mit steriler PBS gesäubert und in drei, etwa gleich große Teile durchtrennt. Jedes Teilstück der Wirbelsäule wurde mit einem Schnitt halbiert, dessen Ebene dorsal - ventral verlief. Der Schnitt mußte gerade verlaufen und durfte den Wirbelkanal nicht verlassen, da ansonsten der Verlust der Hinterwurzelganglien drohte. Die gewonnenen Wirbelsäulenhälften wurden in einer

zuvor bereitgestellten Petrischale (d=95 mm) in Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM + 0,25 % Gentamycin) aufbewahrt.

### 3.3.2. Isolierung der Hinterwurzelganglien

Die Isolierung der Hinterwurzelganglien erfolgte in DMEM in Petrischalen (d=35 mm). Zur optischen Vergrößerung wurde unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Jena, Deutschland) gearbeitet. Die Ganglien wurden mittels Augenschere und Pinzette einzeln entnommen und in einer weiteren Petrischale (d=35 mm) in DMEM gelagert. Die Entnahme der Ganglien mußte zügig erfolgen, da eine möglichst kurze Verweildauer bei Raumtemperatur und ausreichender Nahrungsversorgung erreicht werden sollte. Die Ganglien mußten vorsichtig behandelt werden, da sie bei stärkeren mechanischen Reizen zerstört werden konnten. Nach Isolierung aller Ganglien wurden überschüssige Bindegewebsreste und Blutgefäße ebenfalls mittels Augenschere und Pinzette unter dem Stereomikroskop entfernt. So sollte eine möglichst reine Neuronenkultur, frei von Fremdzellen, erzeugt werden.

### 3.3.3. Herstellung der Neuronenkultur

Zur Isolierung der Neurone aus den Ganglien bedurfte es der enzymatischen Aufspaltung der Ganglienhülle. Das wurde mit der nachfolgenden Kollagenase- und Trypsinbehandlung erreicht.

#### 3.3.3.1. Kollagenasebehandlung

Kollagenase ist ein Kollagen spaltendes Enzym, identisch mit Clostridiopeptidase. Es bewirkt eine unspezifische Aufspaltung der Bindegewebsanteile der Ganglienhülle. Die gesäuberten Ganglien wurden in Petrischalen (d=75 mm) mit auf 37° Celsius erwärmter Kollagenase (243 U/ml; gelöst in Ham`s F12) umgelagert und für 100 min im Brutschrank bei 37° Celsius und 3,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurden die Ganglien unter der Sterilbank zweimal mit steriler PBS ohne Kalzium- und Magnesiumzusatz gewaschen. Kalzium- und Magnesiumfreiheit der sterilen PBS waren wichtig, da beide Zusätze als Inhibitoren der Trypsinaktivität fungieren. Ein behutsames Vorgehen war wegen der Zerstörungsgefahr der Ganglien wichtig. Es wurden Sigmacote - geblockte,

feuerpolierte Pasteurpipetten verwendet, da die so erhaltenen, glatten Pipettenoberflächen die Zerstörung der Ganglien auf ein Minimum reduzierte.

#### 3.3.3.2. Trypsinbehandlung

Trypsin ist eine Serinprotease. Bei pH=7 - 8 spaltet dieses proteolytische Enzym Peptide, Amide und Ester durch Hydrolyse, vor allem Peptidbindungen, an denen Lysin- oder Arginincarboxylgruppen beteiligt sind. Die Trypsinbehandlung bewirkte somit eine spezifische Spaltung der Ganglienhülle, sodaß anschließend die Isolierung der Neurone möglich war. Zu den gewaschenen Ganglien wurde nun auf 37° Celsius erwärmtes Trypsin (10000 U/ml; gelöst in DMEM) zugegeben und für 11 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Ganglien zweimal mit DMEM unter der Sterilbank gewaschen.

#### 3.3.3.3. Vereinzelung der Neurone

Nach enzymatischer Behandlung erfolgte die mechanische Vereinzelung der Neurone durch mehrmaliges Schütteln und Auf- und Abziehen der Ganglien in einer beschichteten Pasteurpipette (siehe 3.3.3.1.). Auf 2 ml Restvolumen, bestehend aus DMEM und den enzymatisch behandelten Ganglien, wurden jeweils 2 ml DMEM zugegeben, die Neurone mechanisch vereinzelt, der Überstand abgesaugt und in einem sterilen Sammelgefäß aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde fortgeführt, bis alle Neurone vereinzelt waren und ein definiertes Endvolumen von 14 ml, bestehend aus DMEM und vereinzelt Neuronen, erreicht wurde. Diese Zellsuspension wurde 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0, Hanau, Deutschland). Circa 10 ml des Mediums wurden unter der Sterilbank abgesaugt und durch steriles DMEM ersetzt. Der durch Zentrifugation entstandene Niederschlag am Boden wurde durch forciertes Einfüllen des frischen DMEM leicht gelöst. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde erneut bis auf ein kleines Restvolumen von 0,5 ml abgesaugt und mit sterilem Ham's F12 + Nährmedium (siehe 3.2.1.) auf 4 ml aufgefüllt und bei gleichen Bedingungen zum dritten Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bis auf das Volumen abgesaugt, das für die Beimpfung der vorbereiteten Deckgläschen nötig war. Die Zellen wurden durch Auf- und Abziehen mittels Eppendorfpipette resuspendiert. Jeweils 50 µl wurden mit der Eppendorfpipette



auf die Deckgläschen gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° Celsius und 3,5 % CO<sub>2</sub> 3 Tage inkubiert. Die Fütterung der Zellen mit Ham's F12 + Nährmedium erfolgte erstmals am Folgetag morgens um 8 Uhr nach der Präparation sowie jeden weiteren Tag morgens um 8 Uhr. Je nach Versuchsanordnung erfolgten alle 2 Stunden von 8 – 18 Uhr Zugaben verschiedener Stoffgruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen.

### 3.4. Regulationsversuche

#### 3.4.1. Interleukin 6 (IL6) – Zugabe

Um die Frage zu klären, welche Mediatoren im Entzündungsfall die Regulation der Neurokinin 1 (NK1) – und Bradykinin 2 (B2) - Rezeptoren an DRG-Neuronen der Ratte bewirkten, wurde in diesen Regulationsversuchen IL6 in verschiedenen Konzentrationen zu den bei 37° Celsius und 3,5 % CO<sub>2</sub> inkubierten Neuronenkulturen gegeben. 10 µg IL6 (Firma Biosource) wurden in 0,904 ml Zitronensäure (20 mM) gelöst und es wurde ein pH=7,4 eingestellt. Die Lösung ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) wurde in Aliquots definierten Volumens bei –80° Celsius gelagert und für die entsprechenden Versuche kurz vorher aufgetaut. IL6 wurde in den Endkonzentrationen  $5 \cdot 10^{-8}$  M,  $5 \cdot 10^{-7}$  M und  $5 \cdot 10^{-6}$  M zugegeben. Die Zugaben erfolgten zwei Tage aller zwei Stunden von 8 Uhr bis 18 Uhr, beginnend am Morgen nach der Präparation der DRG-Neurone. Mit der 8 Uhr - Zugabe erfolgte ebenfalls die Fütterung der Zellen mit Ham's F12 + Nährmedium. Am Abend des zweiten Zugabetages wurden die Zellen eine Stunde nach der letzten Zugabe fixiert (siehe 3.5.1, 3.5.3). Ebenfalls liefen Kontrollgruppen mit, denen kein IL6 zugesetzt wurde.

#### 3.4.2. Mek-Kinase – Inhibitor

Um testen zu können, ob die IL6 - induzierte Regulation des NK1 – und B2 – Rezeptors über einen Transduktionsweg läuft, bei dem unter anderem die Mek-Kinase beteiligt ist, wurde IL6 der Konzentration  $5 \cdot 10^{-7}$  M in beschriebener Weise (siehe 3.4.1) zusammen mit einem Inhibitor der Mek-Kinase (1,4 Diamino-2,3 olicyano-1,4 bis[o-aminophenylmercapto]-butadiene,  $10^{-7}$  M) zur Neuronenkultur gegeben.

Der Inhibitor der Mek-Kinase (1 mg, Firma Sigma) wurde in 263,6  $\mu$ l DMSO (Dimethylsulfoxide) gelöst, sodaß eine  $10^{-2}$  M Lösung vorlag, die bei  $-4^{\circ}$  Celsius gelagert wurde.

#### 3.4.3. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) – Zugabe

Um den eventuell gemeinsamen Signaltransduktionsweg von PGE<sub>2</sub> und IL6 über die Mek - Kinase zu untersuchen, wurde PGE<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M) mit dem unter 3.4.2. beschriebenen Mek-Kinase – Inhibitor ( $10^{-7}$  M) zur Neuronenkultur gegeben.

#### 3.4.4. Indomethacin – Zugabe

Indomethacin ist ein Inhibitor der Cyclooxygenase und wurde in der Konzentration  $10^{-6}$  M in dem unter 3.4.1. beschriebenen Zugabeschema zur Neuronenkultur gegeben.

#### 3.4.5. Enzym – linked – immunosorbent – assay (ELISA) zur PGE<sub>2</sub>-Gehaltbestimmung der Überstände

Um auszuschließen, daß die Hochregulation der NK1 - Rezeptoren nach IL6-Zugabe indirekt über eine Erhöhung des PGE<sub>2</sub>-Gehaltes geschieht, wurde am Morgen des zweiten Tages nach der Inkubation der Neuronenkultur der Überstand (ca. 1 ml) vor der Fütterung der Zellen abgezogen und mit Hilfe eines ELISA der Firma Cayman untersucht. Dabei wurden Überstände einer Standardkultur ohne Mediatorzusätze und Überstände der Regulationsversuche untersucht, bei denen die Zugabe von IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M), Indomethacin ( $10^{-6}$  M) und IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) + Indomethacin ( $10^{-6}$  M) aller zwei Stunden über zwei Tage erfolgte.

Das Prinzip dieses Versuchs basiert auf einer oberflächengebundenen Immunkomplexreaktion, wobei das nachzuweisende PGE<sub>2</sub> im „Sandwich“ von primärem und sekundärem Antikörper gebunden wurde (siehe Abb. 5).

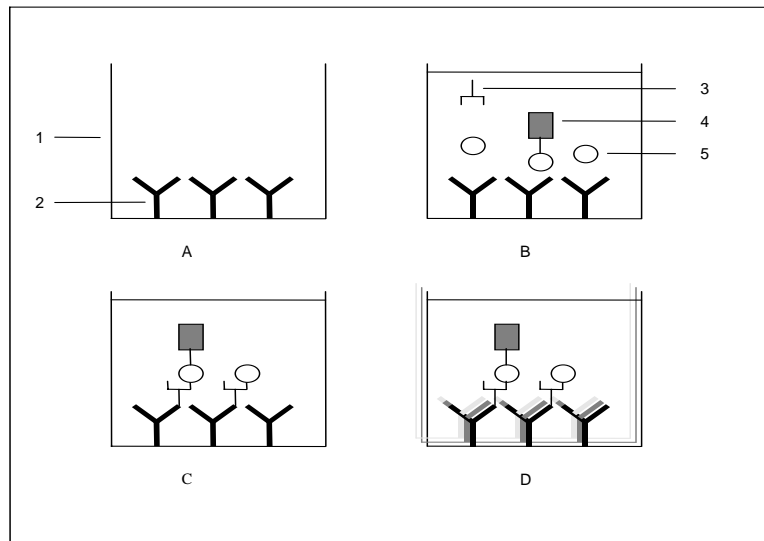


Abb. 5 : Schematische Darstellung des ELISA – Tests der Firma Cayman

5A: Auf der Oberfläche der Mikrotiterplatten (1) befindet sich der sekundäre Anti – Maus – Antikörper, gezogen in Ziege (2).

5B: Nach Inkubation mit dem primären, monoklonalen PGE<sub>2</sub> – Antikörper (3), PGE<sub>2</sub> – Acetylcholinesterase (4) und dem zu untersuchendem Überstand mit enthaltenem freien PGE<sub>2</sub> (5) erfolgt die Bindung im „sandwich“ der genannten Bestandteile.

5C: Nach 18 h Inkubation wurden die ungebundenen Bestandteile mittels Waschlösung entfernt.

5D: Danach erfolgte die Zugabe von Ellman`s Farbreagenz. Die Enzymreaktion konnte durch den Farbumschlag nach gelb visualisiert und bei der Wellenlänge von 412 nm gemessen werden.

Im von der Firma Cayman verwendeten Kit befand sich der sekundäre Antikörper (Anti – Maus - Antikörper, gezogen in Ziege) an der Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatten. Zugegeben wurden der primäre Antikörper (monoklonaler PGE<sub>2</sub> – Antikörper), das Enzym (PGE<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase) und der zu untersuchende Überstand der Neuronenkultur bzw. Standards und Negativkontrollen. Nach 18 h Inkubation bei 4° Celsius wurden ungebundene Bestandteile mit einer Waschlösung entfernt, anschließend wurde das Ellman`s - Farbreagenz zugegeben. Nach 60 - 90 min konnte die Enzymreaktion als Farbumschlag nach gelb spektrographisch bei der Wellenlänge 412 nm gemessen werden (Cayman Chemical Company, Katalognr. 514010). Die Farbintensität spiegelte die im Überstand enthaltene PGE<sub>2</sub> – Menge wider, die mit Hilfe der Standardkurve errechnet werden konnte. Die Messung erfolgte mit dem Spektrometer Sunrise (Firma Tecan, Crailsheim, Deutschland) und der dazugehörigen Software Magellan (Firma Tecan, Crailsheim, Deutschland). Um die PGE<sub>2</sub> – Konzentration vergleichen zu können, wurde die PGE<sub>2</sub> – Konzentration (pg/ml)

auf jeweils 100 DRG – Neurone zurück gerechnet. Die Anzahl der Neurone wurde vorher in einer geeigneten Zählkammer ermittelt.

#### 3.4.6. Kalzium - Imaging - Technik

Die funktionelle Untersuchung der kultivierten DRG – Neurone mit Hilfe der Kalzium - Imaging – Technik hatte zwei Ziele: Erstens sollte der Anteil der DRG – Neurone bestimmt werden, die einen funktionell intakten IL6 – Rezeptor – Komplex besaßen. Zweitens sollte der Nachweis erbracht werden, ob sich die durch IL6 induzierte Hochregulation des NK1 – Rezeptors auf funktioneller Ebene bestätigen ließ.

Zur Messung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wurde der Kalziumchelator Fura – 2 benutzt. Fura - 2 ist sehr selektiv für  $Ca^{2+}$  und fast unempfindlich für pH - Schwankungen im physiologischen Bereich (Grynkiewicz et al. 1985). Das Molekül gelangt unterstützt durch Pluronic in die Zelle. Pluronic unterstützt die Membrangängigkeit des Fura – 2 und dessen Verteilung in der Zelle. Intrazellulär bindet Fura – 2  $Ca^{2+}$  mit vier Carboxylgruppen. Die Fluoreszenz von Fura – 2 ändert sich sowohl in Abhängigkeit der Wellenlänge des Anregungslichts als auch von der  $Ca^{2+}$  - Bindung. Fura – 2 absorbiert Licht der Wellenlänge 340 nm im  $Ca^{2+}$  - gebundenen Zustand, Licht der Wellenlänge 380 nm im  $Ca^{2+}$  - freien Zustand. Sowohl im  $Ca^{2+}$  - gebundenen Zustand als auch im  $Ca^{2+}$  - freien Zustand emittiert Fura – 2 Licht der Wellenlänge 510 nm (Grynkiewicz et al. 1985, Tsien 1988).

Die Zellen wurden mit 5  $\mu$ M Fura - 2/AM und Pluronic F127 in Ham's F12 + Nährmedium für 30 min lichtgeschützt inkubiert. 5  $\mu$ M Fura – 2/AM wurde der Stammlösung, bestehend aus 1 mM/ml Acetoxymethyl-Ester von Fura – 2 (Fura - 2/AM) gelöst in DMSO, entnommen. Danach schloß sich ein Waschvorgang mit HEPES - Puffer (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1piperazino]-ethansulfonsäure) an, der fünfmal für je 4 min durchgeführt wurde. Anschließend wurden die neuronengewachsenen Deckgläschen in die Meßkammer (aufrechtes Mikroskop Nikon Eclipse E600FN, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) umgelagert. Dort wurden die Zellen zunächst mit HEPES – Puffer (2 ml/min) perfundiert. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Perfusion wurde vor jedem Experiment gestoppt, nach 10 s 100  $\mu$ l Testvolumen (HEPES - Puffer) und nach 30 s IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) zugegeben. Am Ende jeder Messung (nach 80 ms) wurden zur Vitalitätsprobe 50 mM Kalium zugegeben.

Während des Versuchsprotokolls wurden die DRG - Neurone abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm angeregt (Monochromator Polychrome IV, T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Deutschland). Die Beleuchtungsdauer betrug circa 50 ms. Die Emission wurde bei der Wellenlänge 510 nm mit einer CCD - Kamera (T.I.L.L. Photonics) gemessen und im Computer gesammelt. Dies erfolgte mittels der T.I.L.L. Photonics - Software. Die Messungen erfolgten alle 260 ms. Für jedes Bildpaar wurde das Verhältnis der gemessenen Intensitäten bei 340 nm und 380 nm abzüglich des jeweiligen Hintergrundes gebildet. Um die lokale Änderung der ( $[Ca^{2+}]_i$ ) von den so erhaltenen Verhältnisbildern bestimmen zu können, wurde der Umfang der Zellen im Sichtbereich markiert und somit die Meßfläche (ROI = region of interest) festgelegt. Der so erhaltene Wert entsprach dem Mittelwert der Fluoreszenz jeder ausgewählten Zelle und wurde als Funktion der Zeit dargestellt. Dieser Versuch wurde mit Standardneuronenkulturen sowie mit IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) behandelten Neuronenkulturen (siehe 3.4.1.) durchgeführt.

### 3.5. Rezeptormarkierungen

Anhand der entsprechenden Markierungsprotokolle wurden der NK1 – Rezeptor, der B2 – Rezeptor und das Glykoprotein 130 (Gp 130) markiert.

#### 3.5.1. NK1-Markierung (siehe auch Tabelle 1)

Die Zellen wurden nach 3 Tagen Kultivierung mit PBS plus 0,3 % Triton X-100 gewaschen und anschließend für 30 min mit 2 % Paraformaldehyd und 0,05 % Glutaraldehyd plus 0,3 % Triton X-100 fixiert. Die Verwendung von Triton X-100 war notwendig, da der anti - NK1 – Antikörper gegen eine intrazelluläre Rezeptordomäne hergestellt wurde. Nach Ablauf der 30 min Fixationszeit erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS plus 0,3 % Triton X-100. Anschließend erfolgte der Aldehydblock für 30 min mit 50 mmol Glycin in PBS plus 0,3 % Triton X-100. Dieser diente zum Blockieren eventuell verbliebener Aldehydbestandteile. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 2 % Gelatine in PBS plus 0,3 % Triton X-100 für 30 min und eine Inkubation mit 2 % Ziegenserum in PBS plus 0,3 % Triton X-100. Diese beiden Blockierungsschritte erfolgten, um unspezifisch Bindungsstellen zu maskieren. Die Auswahl des Serums richtete sich daher nach dem verwendeten sekundären

Antikörper. Im Fall der NK1 - Rezeptormarkierung wurde Ziegenserum verwandt. Es schloß sich nach Ablauf der 30 min Serumblock ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS, 0,1 % BSA-C plus 0,3 % Triton X-100 an. BSA - C ist ein mit Methylgruppen „verlängertes“ Rinderserum, dessen längliche Molekülform die Blockade unspezifischer Bindungsstellen optimiert.

Die aufgeführten Behandlungsschritte mußten kontinuierlich und ohne Zeitverzögerung durchgeführt werden. Daran schloß sich das Aufbinden des primären Antikörpers an. Dazu wurde der anti - NK1 - Antikörper verwandt, der in Kaninchen hergestellt wurde. Dieser primäre Antikörper wurde 1:100 in PBS plus 0,3 % Triton X-100 plus 2 % Serum verdünnt und 50 µl auf jedes Plättchen aufgetragen. Die Kontrollgruppen erhielten an dieser Stelle 50 µl PBS plus 0,3 % Triton X-100 plus 2 % Serum ohne den primären Antikörper. Die Inkubation mit dem anti - NK1 – Antikörper erfolgte für 24 h bei 4° Celsius in einer feuchten Kammer. Nach viermaligem Waschen der Plättchen mit PBS plus 0,3 % Triton X-100 konnte der sekundäre, Gold – gekoppelte Ziegen – Anti - Kaninchen Antikörper für 3 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer (verdünnt 1:100 in PBS plus 0,3 % Triton X-100 plus 2 % Serum) aufgebunden werden. Nach erneutem Waschvorgang mit PBS plus 0,3 % Triton X-100 (4 x) und ddH<sub>2</sub>O (5 x) erfolgte die Silberfärbung zur optischen Darstellung der markierten Rezeptoren. Nach circa 15 min war bei 21° Celsius die Redoxreaktion abgelaufen, bei der die am sekundären Antikörper befindlichen Goldpartikel die Silberionen reduziert hatten und so metallisches Silber entstanden war, das sich am Goldpartikel ablagerte (siehe Abb. 6). Das so vergrößerte Goldpartikel konnte lichtmikroskopisch als schwarzes Reaktionsprodukt sichtbar gemacht werden (Liddell und Weeks 1996).

Um die auf den Deckgläschen befindlichen Neurone und deren Markierung lichtmikroskopisch untersuchen zu können, war die Einbettung in das Kunstharz DePeX notwendig. Die Deckgläschen wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 100%) entwässert, dann mit Terpinol, abschließend mit Xylol gespült, um dann in dem Kunstharz DePeX dauerhaft lagerfähig gemacht werden zu können.

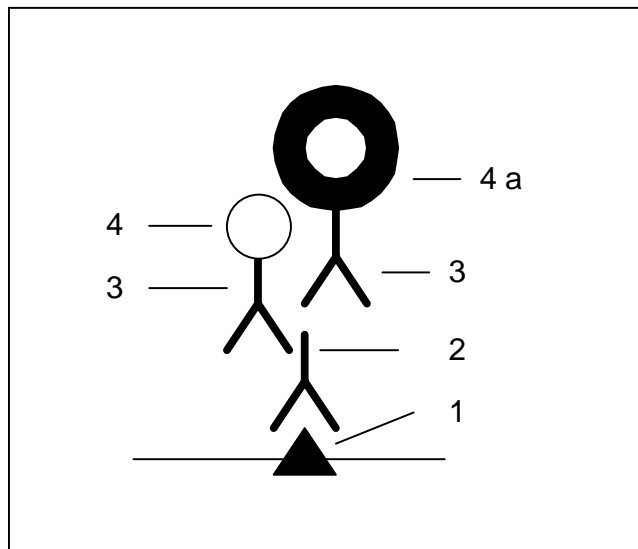


Abb. 6 : Schematische Darstellung der NK1 – Rezeptormarkierung

An den NK1 – Rezeptor (1) bindet der primäre anti - NK1 – Antikörper (2), der in Kaninchen hergestellt wurde. Daran bindet der sekundäre, in Ziege gezogene, anti – Kaninchen – Antikörper (3), an den ein 10 nm Goldpartikel (4) gekoppelt ist. Nach Silberfärbung und abgelaufener Redoxreaktion führen die reduzierten Silberionen zur Vergrößerung des Goldpartikels (4a).

### 3.5.2. Markierung des Glykoprotein 130 (siehe auch Tabelle 1)

Die Markierungsschritte bis zum Aufbinden des primären Antikörpers erfolgten analog dem unter 3.5.1 beschriebenen Vorgehen.

Als primärer Antikörper wurde ein Anti – Glykoprotein - 130 – Antikörper (Anti – gp 130 – Antikörper) verwandt, der in Kaninchen hergestellt wurde. Das zu markierende Epitop lag in der extrazellulären Domäne des Gp130 (Aminosäuresequenz 365 – 619). Es wurden zwei verschiedene Versuchsmodelle durchgeführt. Im ersten Modell enthielten alle Lösungen den Zusatz 0,3 % Triton X-100, während im zweiten Modell dieser Zusatz nicht verwandt wurde. Zur optischen Darstellung des Gp 130 wurde als sekundärer Antikörper ein 10 nm – Gold - Anti – Kaninchen - Antikörper (Gold - konjugierter Antikörper) verwandt, der in Schaf hergestellt wurde.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Seren

<b>Rezeptor- markierung</b>	<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Serum</b>
Neurokinin 1 (NK1) – Rezeptor	anti - NK1 - entwickelt in Kaninchen	anti – Kaninchen - entwickelt in Ziege - goldkonjugiert 10 nm	Ziegenserum
Glykoprotein 130	Glykoprotein 130 – Antikörper - entwickelt in Kaninchen	anti – Kaninchen - entwickelt in Schaf - goldkonjugiert 10 nm	Schafserum

### 3.5.3. Darstellung von Bradykininrezeptoren mit Gold – gekoppeltem Bradykinin

Die Darstellung des Bradykinin – Rezeptors erfolgte mit Gold – gekoppeltem Bradykinin, da momentan kein zuverlässiger Antikörper zur Verfügung steht (Segond von Banchet und Heppelmann 1995). Die Herstellung des Bradykinin – Gold – Partikels erfolgte gemäß Segond von Banchet und Heppelmann (1995).

Die Markierung von Bradykinin – Bindungsstellen erfolgte nach folgendem Protokoll: Waschung nach dreitägiger Inkubationszeit mit PBS, Fixierung, dreimaliger Waschvorgang mit PBS und Aldehydblock erfolgten analog zur NK1 – Rezeptormarkierung (siehe 3.5.1.), mit der Ausnahme, daß alle Schritte ohne Zusatz von 0,3 % Triton X-100 ausgeführt wurden, da der Bradykinin - Gold - Partikel extrazellulär bindet und somit die Perforation der Zellmembran nicht nötig war. Der sich an den Aldehydblock anschließende Proteinblock erfolgte für 30 min mit 5 % BSA, 0,1 % Gelatine in PBS. Anschließend wurde ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS, 0,1% BSA-C durchgeführt. Die Zellen wurden nun bei 4° Celsius für 24 h in einer feuchten Kammer mit je 50 µl des Bradykinin - Gold - Partikels (0,6 nmol) in PBS inkubiert. Die Kontrollgruppen erhielten an dieser Stelle 50 µl PBS.



In Verdrängungsexperimenten wurde die Spezifität des Bradykinin – Gold – Partikels zu B2 - Rezeptoren bewiesen. Analog dazu wurden Markierungsexperimente in beschriebener Weise durchgeführt, wobei zusätzlich ein kompetitiver Antagonist zum B2 - Rezeptor (D-Phe<sup>7</sup>–Bradykinin) verwandt wurde. Dieser wurde in tausendfachem Überschuß zur Versuchsreihe dazugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit schloß sich ein Waschvorgang mit PBS, 0,1 % BSA-C (4 x) und PBS (3 x) an. Mit 2 % Glutaraldehyd in PBS wurde 10 min nachfixiert. Abschließend erfolgten die Silberfärbung und die Einbettung in unter 3.5.1 genannter Weise.

### 3.6. Darstellung des Glykoprotein 130 an histologischen Schnitten von DRGs

Zusätzlich zur unter 3.5.2. beschriebenen Rezeptormarkierung wurde das Glykoprotein 130 an histologischen Schnitten der Ganglien dargestellt.

Das wurde mit der Avidin – Biotin – Methode verwirklicht (siehe Abb. 7). Sie basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Diese Technik ist eine vielseitig einsetzbare und sehr spezifische Methode auf dem Sektor der Immunperoxidase – Färbemethoden (Bourne 1989). Dazu wurden die Ganglien in unter 3.3.1 und 3.3.2 beschriebener Weise isoliert und in 4 % Paraformaldehyd und 0,2 % Glutaraldehyd mindestens 3 h bis 3 Tage bei 4° Celsius fixiert. Die Ganglien wurden mit der aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %) für je 30 min entwässert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit Methylbenzoat. Dann erfolgte die Paraffineinbettung der Ganglien. Anschließend wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte mit dem Mikrotom (Schlittenmikrotom, Fa. Reichert, Österreich) hergestellt. Diese wurden durch die Behandlung mit Xylol für zweimal 10 min, die absteigende Alkoholreihe für 30 min bis hin zum Wasser entparaffiniert. Um von Paraformaldehyd maskierte Antigene zu demaskieren, wurden die Ganglien mit Zitratpuffer (0,1 M, pH=6) 1 h bei 3 bar autoklaviert. Anschließend wurden die Schnitte mit je 40 µl des primären Antikörper (Gp – 130 – Antikörper), 1:200 verdünnt in PBS plus 1 % Triton X-100, 1 % Frischgelatine für 24 h bei 4° Celsius in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS für 10 min erfolgte die Inkubation mit je 40 µl des biotinillierten sekundären Antikörpers, 1:200 verdünnt in PBS plus 1 % Triton, 1 % Frischgelatine für 40 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS je 10 min gewaschen und mit 40 µl des peroxidasekonjugierten Avidin – Biotin – Komplexes (ABC – Kit, Firma DAKO, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Abschließend erfolgte die Inkubation mit dem Farbreagens zur Visualisierung der Peroxidase. Die Schnitte wurden danach mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in DePeX eingebettet.

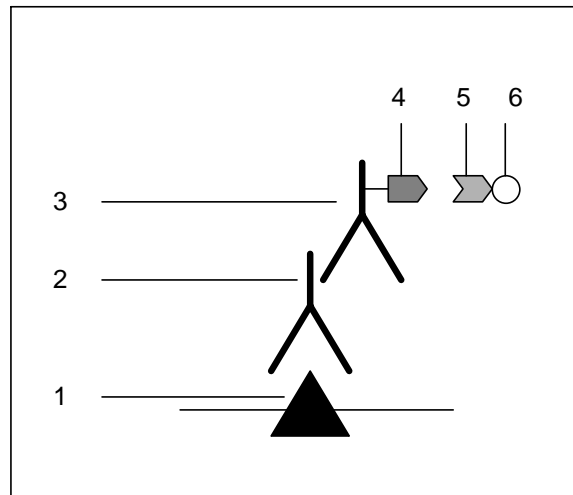


Abb. 7: Schematische Darstellung der Gp 130 – Markierung mittels Avidin – Biotin - Färbemethode

Der Primärantikörper (Anti - Gp 130 – Antikörper, 2) ist gegen das zu bestimmende Antigen (Gp 130, 1 gerichtet). An den Sekundärantikörper (3), der an den primären Antikörper binden kann, ist Biotin (4) gekoppelt. Die freien Stellen des Avidin (5) ermöglichen die Bindung an Biotin. An Avidin ist Peroxidase (6) gekoppelt. Das Enzym Peroxidase – und damit das gesuchte Antigen – kann mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht werden.

### 3.7. Datenerfassung und Auswertung

Alle Versuchsreihen mit den beschriebenen Rezeptormarkierungen, Regulationsversuchen und die Kontrollgruppen wurden nach folgender Weise ausgewertet.

Die in DePeX eingebetteten Plättchen wurden mit Alkohol entfettet und getrocknet und unter dem Lichtmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung auf Neuronenbewuchs beurteilt. Mit einer Videokamera (AVT-BC6, Aalen, Deutschland) und einer speziellen Computersoftware der Firma Zeiss (KS 300, Zeiss, Echingen, Deutschland) wurden die Plättchen nach immer gleicher Vorgehensweise quadrantenweise abgesucht und 100 (in Einzelfällen 50) Zellen zufällig ausgewählt und fotografiert. Diese Zellen wurden markiert und ihr Grauwert,

der Durchmesser und ihre Fläche erfaßt. Um alle Zellen unterschiedlicher Plättchen miteinander vergleichen zu können, mußte der Grauwert, der vor dem Hintergrund unterschiedlicher Plättchen erfaßt wurde, standardisiert werden. Dazu wurde der Grauwert des Hintergrunds gemessen, dessen Mittelwert ermittelt und dieser durch den Grauwert der Zellen dividiert, sodaß der relative Grauwert der Zellen ermittelt werden konnte. Der Grauwert der Kontrollgruppen, die ohne primäre Antikörper - Markierung dieselben Protokollschritte durchliefen, wurde als Grenze angenommen, ab der die Zellmarkierungen als positiv gewertet wurden. Auf der Grauwertskala von 0 (weiß) bis 1 (schwarz) lag diese Grenze bei 0,16. Die Daten der relevanten Versuchsgruppen wurden zusammengefaßt und graphisch nach mittlerer Grauwertverteilung und Flächenverteilung dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung wurden ermittelt und ebenfalls in der Graphik gekennzeichnet. Die Signifikanz wurde mit dem T-Test, zweiseitig für zwei Stichproben, ermittelt. Wenn nötig, wurde die Korrektur für multiple Vergleiche verwandt.

Abweichend davon erfolgte die Auswertung der histologischen Schnitte. Hier wurden die positiven Neurone in einer entsprechenden Zählkammer gezählt. Standardabweichung und Mittelwert wurden bestimmt.

### 3.8. Materialien

Alle verwendeten Materialien werden tabellarisch und nach ihrer Anwendung geordnet in den Tabellen 2 – 5 aufgeführt.

Tabelle 2: Materialien für die Präparation der Wistar - Ratte und Kultur der DRG-Neurone

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Ham`s F12	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Pferdeserum	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin und Streptomycin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NGF 7S mouse recombinant	Sigma, Taufkirchen, Deutschland oder Roche, Mannheim, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sterile PBS (Dulbecco`s	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	
PBS, kalzium- und magnesiumfrei	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase	Paesel und Lorei, Hanau, Deutschland
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sigmacote	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 3: Materialien für Markierungen

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Anti - NK1 – Antikörper	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Bradykinin	Bachem, Heidelberg, Deutschland
(D-Phe-7)- Bradykinin	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Gp 130-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.
Mek-Kinase – Inhibitor	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Anti-Kaninchen-Antikörper (gezogen in Ziege), konjugiert mit Gold 10 nm	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Anti-Kaninchen (gezogen in Ziege), konjugiert mit Cy3	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NHS – Gold	Biotrend, Köln, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Gelatine from cold water fish 45 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ziegenserum	Biotrend, Köln, Deutschland
BSA	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
BSA-C 10%	Biotrend, Köln, Deutschland
Glutaraldehyd	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Paraformaldehyd	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Alkohol 100%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aurion R-Gent	Biotrend, Köln, Deutschland
Vectashild	Vector, Burlingame, CA, U.S.A.

Terpinol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Xylol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
DePeX	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
HEPES-Puffer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Fura-2 in DMSO	Molekular probes, Leiden, Niederlande
DMSO (Dimethyl-Sulfoxide)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EIA Kit Monoclonal	Cayman Chemical Company, MI, U.S.A.
ABC – Kit	Oncogene, Boston, U.S.A.

Tabelle 4: Materialien für Regulationsversuche

Material	Firma
Interleukin 6	Biosource, California, U.S.A.
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland

Tabelle 5: Zusammensetzung wichtiger verwendeter Lösungen:

1. Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS):

- 140 mM Natriumchlorid (NaCl)
- 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl)
- 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 8,1 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

pH = 7,4

2. Neuronen - Nährmedium (Ham`s F12 + Nährmedium):

- 10 % Pferdeserum
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 1 mM L-Glutamin
- 100 ng/mlNGF

in Ham`s F12 gelöst

3. HEPES – Puffer:

- 150 mM NaCl
- 5 mM KCl

- 10 mM Glucose
- 10 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure)
- 2 mM  $\text{CaCl}_2$
- 2 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

pH= 7,4

#### 4. Fixanz

- 2 % Paraformaldehyd
- 0,05 % Glutaraldehyd
- 0,3 % Triton X-100

gelöst in PBS

#### 5. Zitronensäure

- 20 mM Zitronensäure

in Ham`s F12 gelöst

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Regulation des Neurokinin 1 – Rezeptors (NK1 – Rezeptor)

#### 4.1.1. Expression des NK1 – Rezeptors in Abhängigkeit von Interleukin 6 (IL6)

Nach der unter 3.5.1. beschriebenen Markierungsmethode erscheinen die Zellen, die den NK1 – Rezeptor exprimiert haben, in der lichtmikroskopischen Darstellung nach Silberfärbung dunkel. In Abb. 8 sind die Fotografien ausgewählter DRG – Neurone dargestellt, an denen sich das unterschiedliche Färbeverhalten nach der Rezeptormarkierung zeigen läßt. Abbildung 8A zeigt Neurone der Standardkultur, die für drei Tage ohne die Zugabe von Mediatoren bei 37° Celsius und 3,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Abbildung 8B zeigt unter gleichen Bedingungen für drei Tage inkubierte Zellen, die mit IL6 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) entsprechend dem unter 3.4.1. beschriebenem Zugabeschema kultiviert wurden. Hier sind mehr NK1 – positive Zellen vorhanden als sich in Abb. 8A darstellen lassen. Dies läßt auf eine vermehrte NK1 – Rezeptorexpression schließen. In Abb. 8D wird die negative Immunreaktion der Zellen dargestellt, die als Kontrollgruppe für ebenfalls drei Tage bei 37° Celsius und 3,5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Diese Zellen erhielten keinen primären Antikörper.

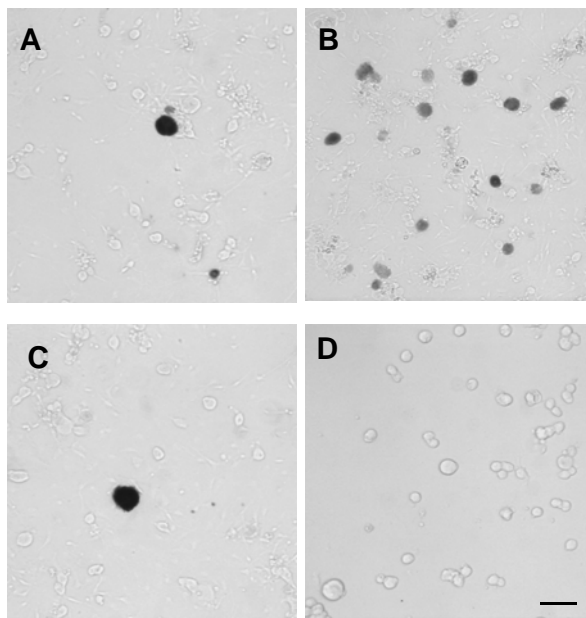


Abb. 8: Darstellung des NK1 – Rezeptors an kultivierten DRG – Neuronen mit goldmarkiertem, sekundären Antikörper und anschließender Silberfärbung  
 8A zeigt die Neurone der Standardkultur. 8B zeigt Neurone nach Inkubation mit IL6 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M), positive Neurone erscheinen dunkel. 8C zeigt Neurone nach Inkubation mit IL 6 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) + Mek–Kinase – Inhibitor ( $10^{-6}$  M). 8D stellt die Neurone der Kontrollgruppe. (Balken = 60 µm)

In Standardkulturen ließ sich nur für einen geringen Anteil der Zellpopulationen ( $8,86\% \pm 4,88\%$ ) eine positive Immunreaktion für den NK1 – Rezeptor darstellen (siehe Abb. 9). Es wurden 700 Zellen aus 7 unabhängigen Kulturen ausgewertet. Nach Zugabe von IL6 der Endkonzentrationen  $5 \cdot 10^{-8}$  M,  $5 \cdot 10^{-7}$  M und  $5 \cdot 10^{-6}$  M konnte eine signifikant erhöhte Expression für den NK1 – Rezeptor an den DRG – Neuronen beobachtet werden, sodaß sich bei circa 30 % der Zellen eine immunpositive Reaktion darstellen ließ. Das läßt auf eine Zunahme der NK1 – Rezeptor - Expression schließen. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse in Abb. 9. Für die IL6 – Zugabe der Konzentration  $5 \cdot 10^{-8}$  M wurden 700 Zellen aus 7 unabhängigen Kulturen ausgewertet, wobei für  $21,62\% \pm 8,19\%$  der Zellen die Immunreaktion positiv gewertet wurde. Für die IL6 – Zugabe der Konzentration  $5 \cdot 10^{-7}$  M wurden insgesamt 500 Zellen aus 5 unabhängigen Kulturen ausgewertet. Dabei konnte für  $32,8\% \pm 8,47\%$  Zellen eine positive Immunreaktion festgestellt werden. Bei der IL6 – Zugabe der Konzentration  $5 \cdot 10^{-6}$  M wurde bei  $27,57\% \pm 8,85\%$  Zellen die Reaktion immunpositiv gewertet, wobei ebenfalls 700 Zellen aus 7 unabhängigen Kulturen ausgewertet wurden. So läßt sich feststellen, daß eine signifikant erhöhte Expression für den NK1 – Rezeptor bei IL6 – Zugabe verschiedener Konzentrationen im Vergleich zur Standardkultur besteht.

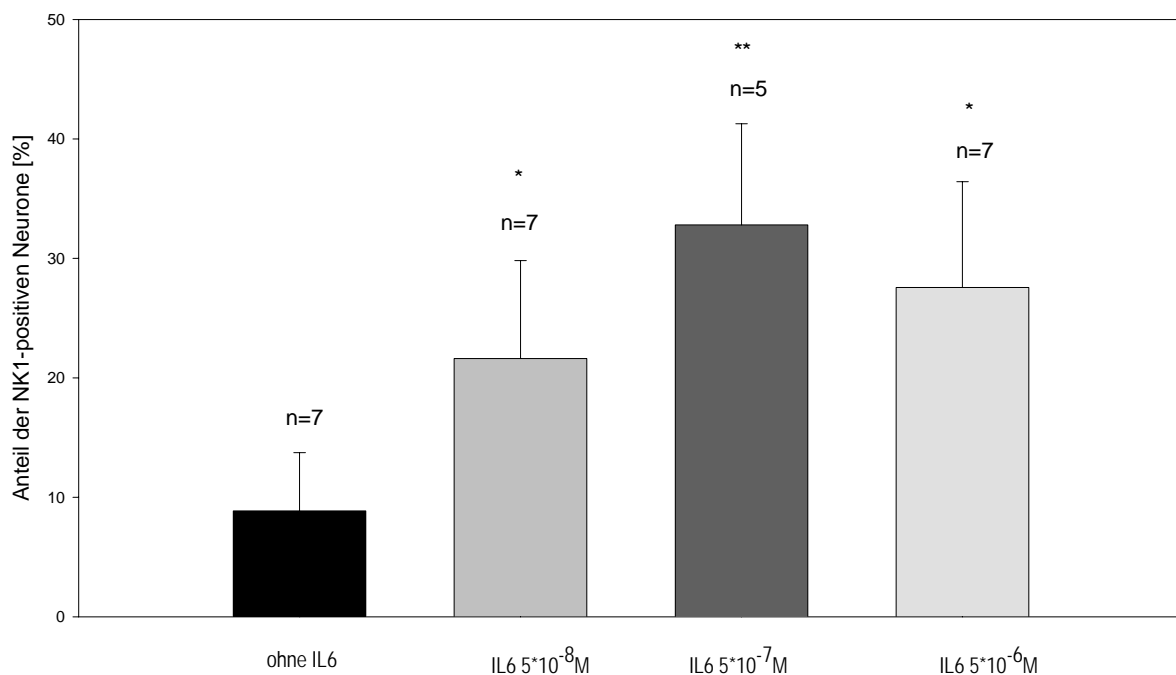


Abb. 9: Graphische Darstellung der NK1 – Rezeptorexpression bei der Standardkultur und bei Kulturen nach Zugabe von IL6 in unterschiedlichen Konzentrationen

\*\* Signifikanz  $< 0,01$  im T – Test, \* Signifikanz  $< 0,05$  im T – Test, getestet gegen Normalbedingungen (ohne IL6)



Die Grauwert- und Größenverteilung der Neurone der Kulturen zeigt Abbildung 10. Im Grauwertbereich von 0 – 0,16 aller Diagramme aus Abbildung 10 sind die Neurone mit negativer Immunreaktion (weiße Balken) dargestellt. Die Grenze 0,16 wurde mit Hilfe der Kontrollgruppen festgelegt, die ohne primären Antikörper kultiviert wurden. Aufgrund der negativen Immunreaktion der Kontrollgruppe muß die Färbung, die auf der Skala von 0 (weiß) bis 1 (schwarz) bis 0,16 reicht, als Eigenfärbung der Neurone angenommen werden und kann daher nicht als Immunreaktion gewertet werden.

Betrachtet man die Grauwertverteilung der positiven Neurone in Abb. 10 (schwarze Balken), so liegt diese bei Standardkulturen im Bereich von 0,16 bis 0,45 (Abb. 10C). Bei Neuronen der IL6 – Zugabekulturen wird der Grauwertbereich der positiven Neurone von 0,16 – maximal 0,8 ausgeweitet (Abb. 10E, 10G, 10I). Sowohl die Verstärkung der gemessenen Farbintensität als auch die quantitative Zunahme der positiven Neurone der IL6 – Zugabekulturen im Vergleich zur Standardkultur lassen auf eine vermehrte Expression des NK1 – Rezeptors schließen. Diese schon in Abbildung 9 dargestellte Aussage soll in Abbildung 10 anhand der Intensitätsverteilung der Grauwerte nochmals verdeutlicht werden. Abb. 10B, 10D, 10F, 10H und 10J zeigen die mittlere Größenverteilung der Neurone. Die positiven Neurone (unterbrochene Linie) der Kulturen mit IL6 – Regulationsversuchen (Abb. 10F, 10H, 10J) zeigen mit Größenverteilungen von 20 – 1500  $\mu\text{m}^2$  keine wesentlichen Abweichungen von den negativen Neuronen (durchgezogene Linie) derselben Kulturen. Die erfaßte Größenverteilung zeigt auch, daß in allen Gruppen eine vergleichbare Neuronenpopulation erfaßt wurde.

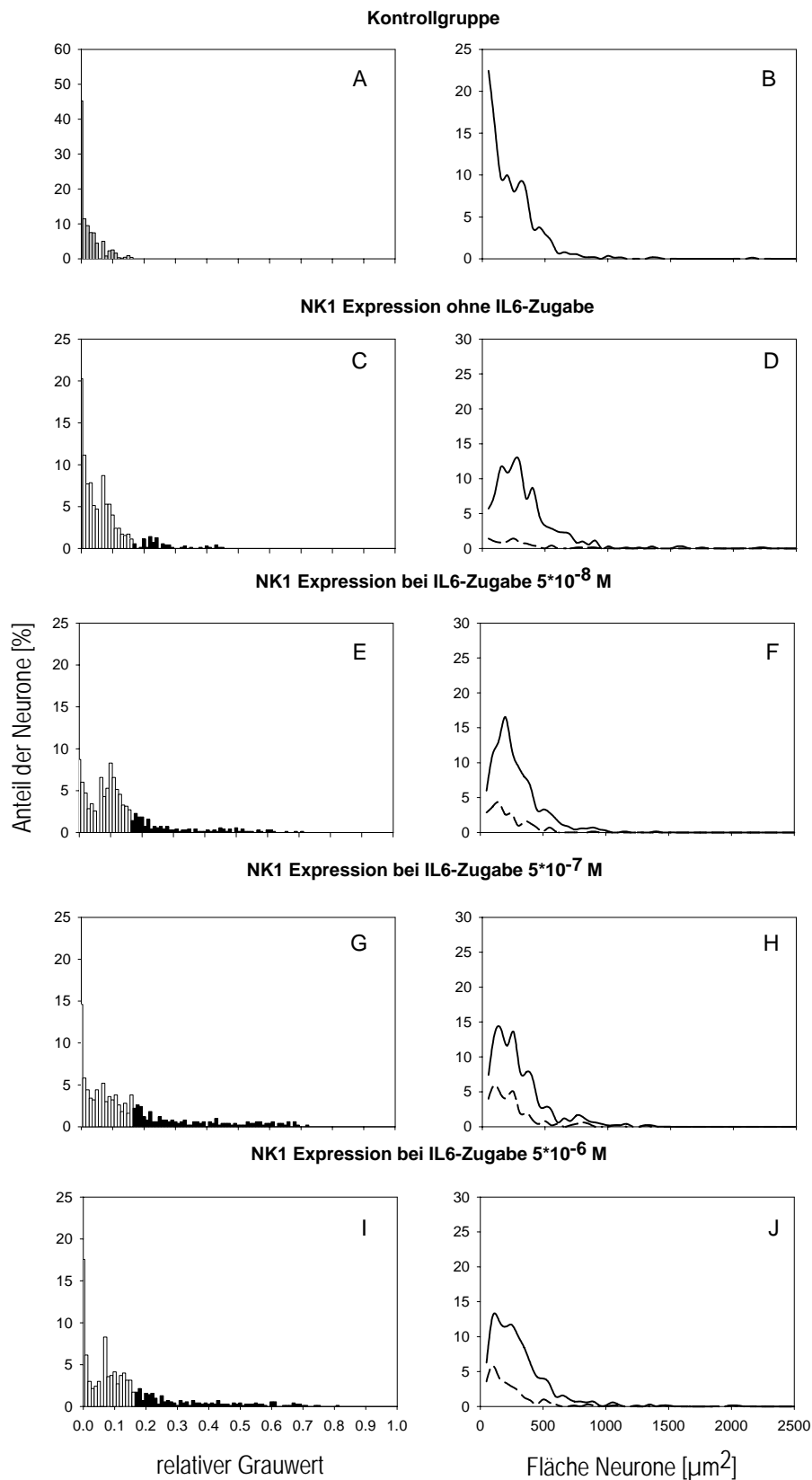


Abb. 10: Graphische Darstellung der relativen Grauwerte und der Größenverteilung der Neurone der Standardkulturen und der Regulationsversuche mit IL6

Die Grauwertverteilung der positiven Neurone (schwarze Balken) und der negativen Neurone (weiße Balken) der entsprechenden Kulturen sind in 10A, 10C, 10E, 10G und 10I dargestellt. Die Größenverteilung der positiven (unterbrochene Linie) und negativen Neurone (durchgezogene Linie) für die entsprechenden Kulturen sind in 10B, 10D, 10F, 10H und 10J dargestellt.

#### 4.1.2. Expression des NK1 – Rezeptors in Abhängigkeit von IL6 zusammen mit dem Mek-Kinase – Inhibitor

Bei den Regulationsversuchen mit IL6 und dem Mek-Kinase – Inhibitor (siehe 3.4.2.) wurden 500 Zellen aus 5 unabhängigen Kulturen ausgewertet. Die Zugabe von IL6 zusammen mit dem Inhibitor der Mek-Kinase erfolgte entsprechend dem dargestellten Zugabeschema (siehe 3.4.1.). In Abb. 8C ist eine repräsentative Fotografie der Neurone des genannten Regulationsversuches dargestellt, bei der deutlich wird, daß sich die dargestellten Neurone in ihrem Färbeverhalten nicht von Neuronen einer Standardkultur (Abb. 8A) unterscheiden. Quantitativ konnte bei Zugabe von IL6 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) zusammen mit dem Mek-Kinase – Inhibitor ( $10^{-6}$  M) für  $7 \% \pm 4,99 \%$  der Neurone eine immunpositive Reaktion festgestellt werden (siehe Abb.11). Die NK1 – Rezeptorexpression liegt hier im Bereich der Expression von Standardkulturen. Daraus kann man schließen, daß eine funktionierende Mek-Kinase für die Hochregulation des NK1 – Rezeptors durch den Einfluß von IL6 essentiell ist. Zur Kontrolle wurden Regulationsexperimente durchgeführt, bei denen nur der Mek-Kinase – Inhibitor ( $10^{-6}$  M) zu den Kulturen gegeben wurde. Dies wurde durchgeführt, um auszuschließen, daß der verwendete Inhibitor selbst einen regulativen Effekt auf die NK1 – Expression hat und daß der Inhibitor vitale Zellfunktionen stört. Für 500 Zellen aus 5 unabhängigen Kulturen wurde bei  $6 \% \pm 4,64 \%$  Zellen eine immunpositive Reaktion bei der NK1 – Rezeptormarkierung gefunden (siehe Abb. 11). Das entspricht der normalen Rezeptorexpression bei Standardkulturen.

Die Grauwert- und Größenverteilung der Kulturen ist in Abbildung 12 dargestellt. Es kann auch hier gezeigt werden, daß der Anteil der immunpositiven Zellen (schwarze Balken) bei Zugabe des Mek-Kinase – Inhibitors der Konzentration  $10^{-6}$  M (Abb. 12C) und bei Zugabe von IL6 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) + Mek-Kinase – Inhibitor der Konzentration  $10^{-6}$  M (Abb. 12E) sehr gering ist und die Farbtintensität hauptsächlich im Bereich zwischen 0,16 und 0,3 liegt. Nur einzelne Neurone zeigen Grauwerte, die auf der Skala von 0 (weiß) bis 1 (schwarz) bis 0,7 reichen. Die positiven Zellen (unterbrochene Linie) in Abb. 12D und 12F liegen in Größenbereichen von  $20 - 50 \mu\text{m}^2$ . Die negativen Zellen (durchgezogene Linie) in Abb. 12D und 12F weisen eine Größenverteilung von  $20 - 2000 \mu\text{m}^2$  auf.

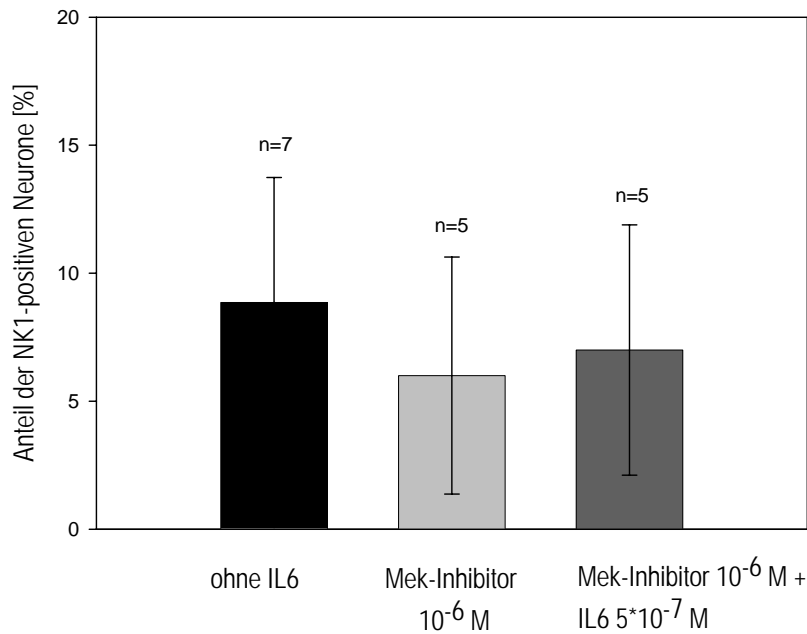


Abb. 11: Graphische Darstellung der NK1 – Rezeptorexpression bei der Standardkultur und nach Zugabe des Mek-Kinase – Inhibitors allein und zusammen mit IL6

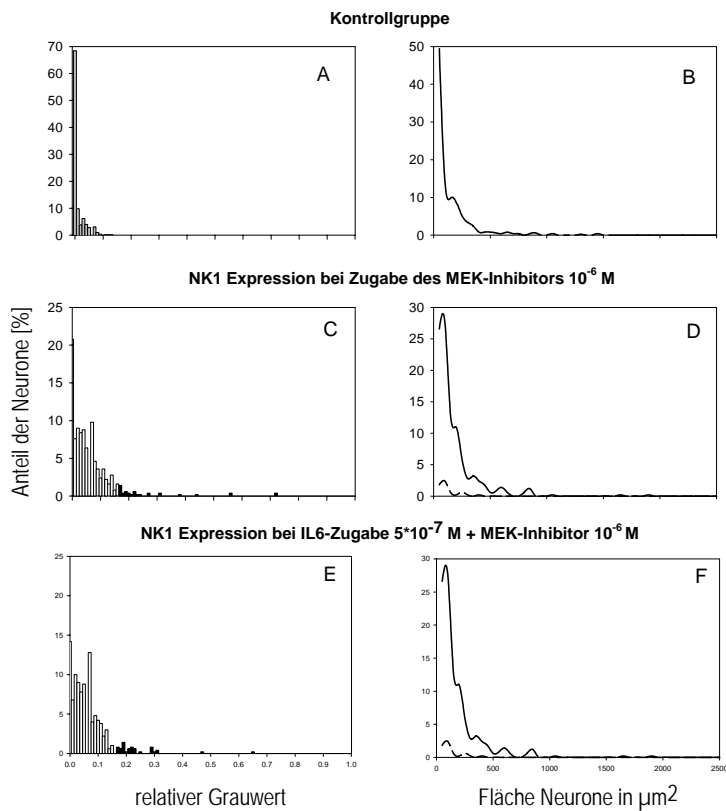


Abb. 12: Graphische Darstellung der Grauwert- und Größenverteilung der Kulturen der Regulationsexperimente mit Zugabe von Mek-Kinase – Inhibitor ( $10^{-6}$  M) und IL6 ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) + Mek-Kinase – Inhibitor ( $10^{-6}$  M)

Abb. 12A, 12C und 12E zeigen die relative Grauwertverteilung der entsprechenden Kulturen mit positiven (schwarze Balken) und negativen (weiße Balken) Zellen. Abb. 12B, 12D und 12F zeigen die Größenverteilung der Kulturen mit positiven (unterbrochene Linie) und negativen (durchgezogene Linie) Zellen.

#### 4.1.3. Expression des NK1 – Rezeptors in Abhängigkeit von PGE<sub>2</sub> und Mek-Kinase Inhibitor

Nach Regulationsexperimenten mit PGE<sub>2</sub> – Zugabe der Konzentration 10<sup>-6</sup> M (siehe 3.4.3.) kann gezeigt werden, daß PGE<sub>2</sub> ebenfalls eine Hochregulation des NK1 – Rezeptors bewirkt. Nach Inkubation der DRG – Neurone mit PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) werden 29 % ± 2 % der Neurone immunpositiv für den NK1 – Rezeptor (siehe Abb. 13). Es wurden 400 Zellen aus 4 Kulturen ausgewertet. Bei Inkubation von PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> M) zusammen mit dem Mek-Kinase – Inhibitor (10<sup>-7</sup> M) kann ein inkompletter Rückgang der Expression des NK1 – Rezeptors beobachtet werden. 15 % ± 3,08 % der Zellen wurden immunpositiv für den NK1 - Rezeptor gewertet. Das sind mehr Zellen, als bei Standardkulturen, die den Rezeptor exprimieren, aber signifikant weniger Zellen als bei PGE<sub>2</sub> – Zugabe, die den Rezeptor exprimieren. Daraus läßt sich schließen, daß der Signaltransduktionsweg des PGE<sub>2</sub> nur teilweise über die Mek-Kinase läuft, aber daneben noch andere Wege zur Signalweiterleitung möglich sind, da der Regulationseffekt von PGE<sub>2</sub> durch den Mek-Kinase – Inhibitor nur zum Teil inhibiert wird. Anders ist dies bei der schon beschriebenen Wirkung des Mek-Kinase - Inhibitors auf die Wirkung von IL6 (siehe 4.1.2.), die hier zum Vergleich erneut graphisch dargestellt ist. Hier führt der Inhibitor zur vollständigen Unterdrückung der Wirkung von IL6.

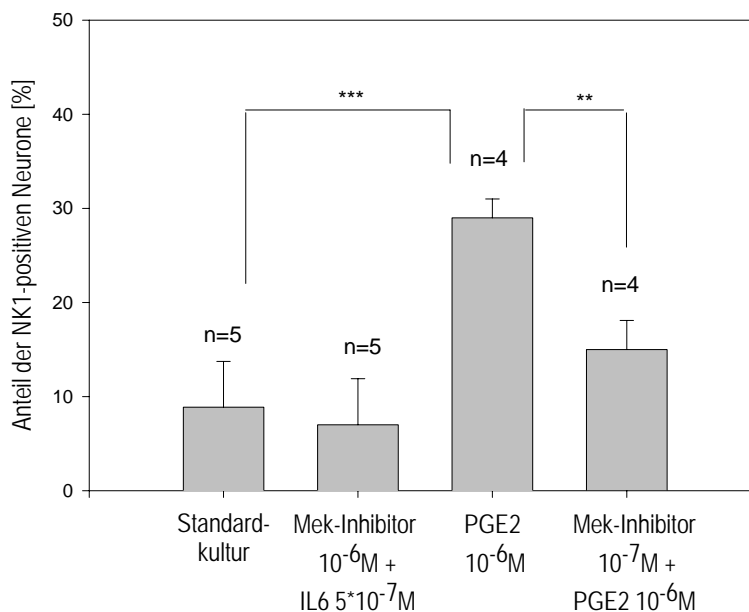


Abb. 13: Graphische Darstellung der NK1 – Expression bei Standardkultur und Kulturen der dargestellten Regulationsexperimente

\*\*\* Signifikanz < 0,0001 im T- Test, \*\* Signifikanz < 0,1 im T – Test

#### 4.1.4. Einfluß von IL6 auf die Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) – Sekretion in der DRG – Neuronenkultur

Um auszuschließen, daß die Hochregulation des NK1 – Rezeptors durch IL6 indirekt über die Stimulation der PGE<sub>2</sub> – Freisetzung aus DRG – Neuronen der Zellkultur bewirkt wird, wurde am Morgen nach der Präparation der Überstand der Kultur entnommen und mit Hilfe des ELISA der PGE<sub>2</sub> – Gehalt bestimmt (siehe 3.4.5.). Zur Kontrolle wurde der PGE<sub>2</sub> – Gehalt der Überstände von Kulturen untersucht, die Indomethacin und Indomethacin + IL6 erhalten hatten (siehe 3.4.4.). Indomethacin ist ein Inhibitor der Cyclooxygenase und verhindert damit die Sekretion von PGE<sub>2</sub>. Für die Standardkultur konnte ein PGE<sub>2</sub> – Gehalt von  $0,39 \pm 0,48$  pg/100 Neurone ermittelt werden. Dabei wurden die Überstände von 7 Kulturen untersucht. Für die Kulturen der Regulationsexperimente mit IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) wurde ein PGE<sub>2</sub> – Gehalt von  $0,72 \pm 1,13$  pg/100 Neurone ermittelt. Die Überstände von 7 Kulturen wurden untersucht. Der PGE<sub>2</sub> – Gehalt ist also nicht signifikant erhöht. Damit kann angenommen werden, daß IL6 keine direkte Stimulation der PGE<sub>2</sub> – Sekretion bewirkt und somit die Hochregulation der Expression des NK1 – Rezeptors ein direkter Effekt des IL6 ist.

Der Überstand der Kulturen mit Indomethacin und Indomethacin + IL6 wies mit  $0,033 \pm 0,004$  bzw.  $0,035 \pm 0,11$  pg/100 Neurone praktisch keinen Gehalt an PGE<sub>2</sub> auf. Hier wurden aus je 4 Kulturen die Überstände untersucht. Abb. 14 stellt die Ergebnisse graphisch dar.

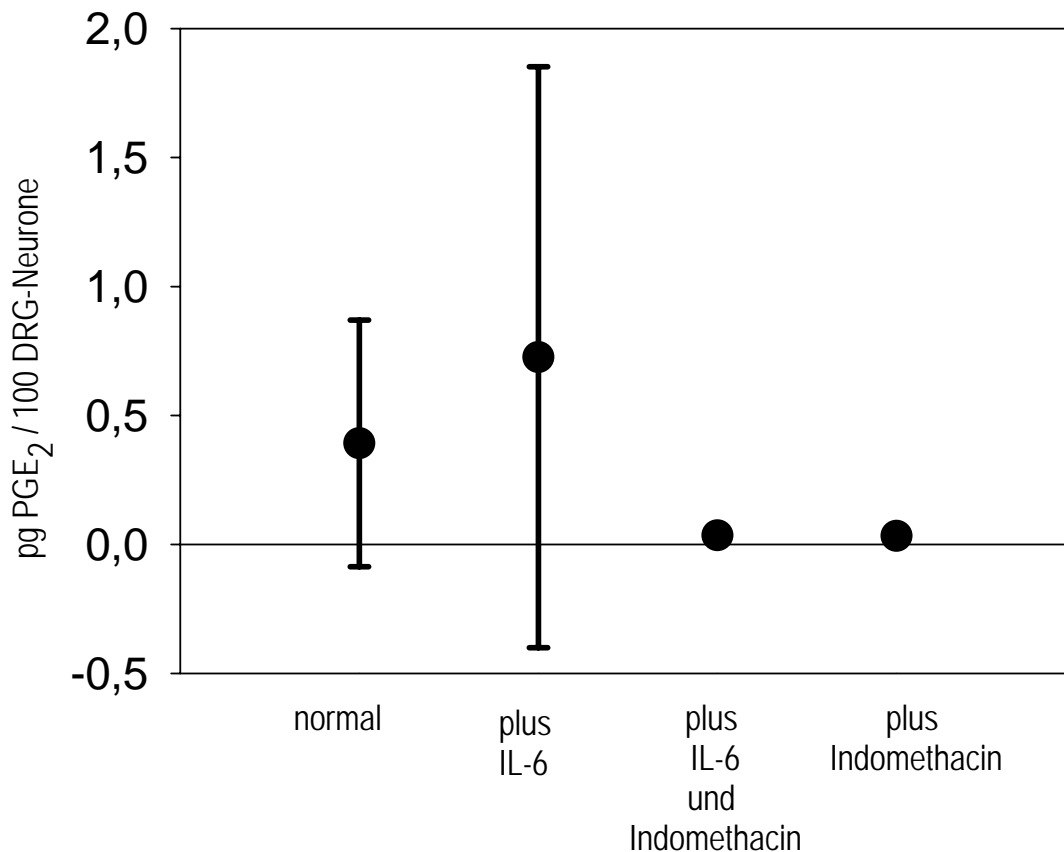


Abb. 14: Graphische Darstellung des ELISA zur Ermittlung des PGE<sub>2</sub> – Gehalts der Überstände der Standardkultur und der Kulturen der Regulationsversuche mit IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M), IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) + Indomethacin ( $10^{-6}$  M) und Indomethacin ( $10^{-6}$  M)

#### 4.1.5. Einfluß von Substanz P (SP) und IL6 auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ )

Ein funktioneller Ansatz wurde zur Verifizierung der mit immunzytologischen Verfahren erhaltenen Ergebnisse zur NK1 – Rezeptorexpression verfolgt. Mit Hilfe des Kalzium - Imaging (siehe 3.4.6.) wurde die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration der DRG – Neurone bei Zugabe von IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M), SP ( $10^{-4}$  M) und Zugabe von SP ( $10^{-4}$  M) mit IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) vorinkubierten Zellen gemessen. Um die Spezifität von SP zum NK1 – Rezeptor zu zeigen, wurden parallel Experimente mit gleichzeitiger Zugabe von SP und einem NK1 – Antagonisten (SR140333) durchgeführt. Die Zellen wurden 10 min vor der SP – Zugabe mit dem Antagonisten vorinkubiert.

Anhand der unter 3.4.6. beschriebenen Versuchsanordnung wurde nach 10 s Puffer zu den Zellen gegeben, um einen intrazellulären Kalziumanstieg durch mechanische Aktivierung von einem Anstieg, ausgelöst durch Reaktion auf Mediatorzugabe,

abzugrenzen. Nach 30 s erfolgte die Zugabe von IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) oder SP ( $10^{-4}$  M). Ausgewertet wurden nur solche Zellen, die keine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Pufferzugabe zeigten, aber auf 50 mM  $K^+$  antworteten. Diese Antwort läßt auf vitale Neurone schließen. In Abb. 15 sind die Ergebnisse dargestellt. 33,3 % (66 von 198 Zellen) der Zellen antworten nach Zugabe von IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abb. 15C). Dies bedeutet, daß ein Drittel aller DRG – Neurone einen funktionellen IL6 – Rezeptor – Komplex in der Membran besitzen muß. Während 13 % (26 von 200 Zellen) der Zellen mit Erhöhung der Kalziumkonzentration nach Zugabe von SP antworten, sind es 30,05 % (55 von 183 Zellen) der Zellen, die eine Antwort nach Zugabe von SP zeigen, die mit IL6 zwei Tage vorinkubiert wurden (Abb. 15C). Damit kann gezeigt werden, daß die durch IL6 vermittelte Erhöhung der NK1 – Rezeptorexpression (siehe 4.1.1.) funktionell Bedeutung hat. Bei Zugabe von SP zu mit dem spezifischen NK1 – Antagonisten SR140333 vorinkubierten Zellen, zeigten nur 2,56 % (4 von 156 Zellen) eine Erhöhung der Kalziumkonzentration (Abb. 15C). Insgesamt bestätigen die Experimente mit dem Kalzium – Imaging die quantitativen Ergebnisse der Hochregulation des NK1 – Rezeptors durch IL6 (siehe 4.1.1.).



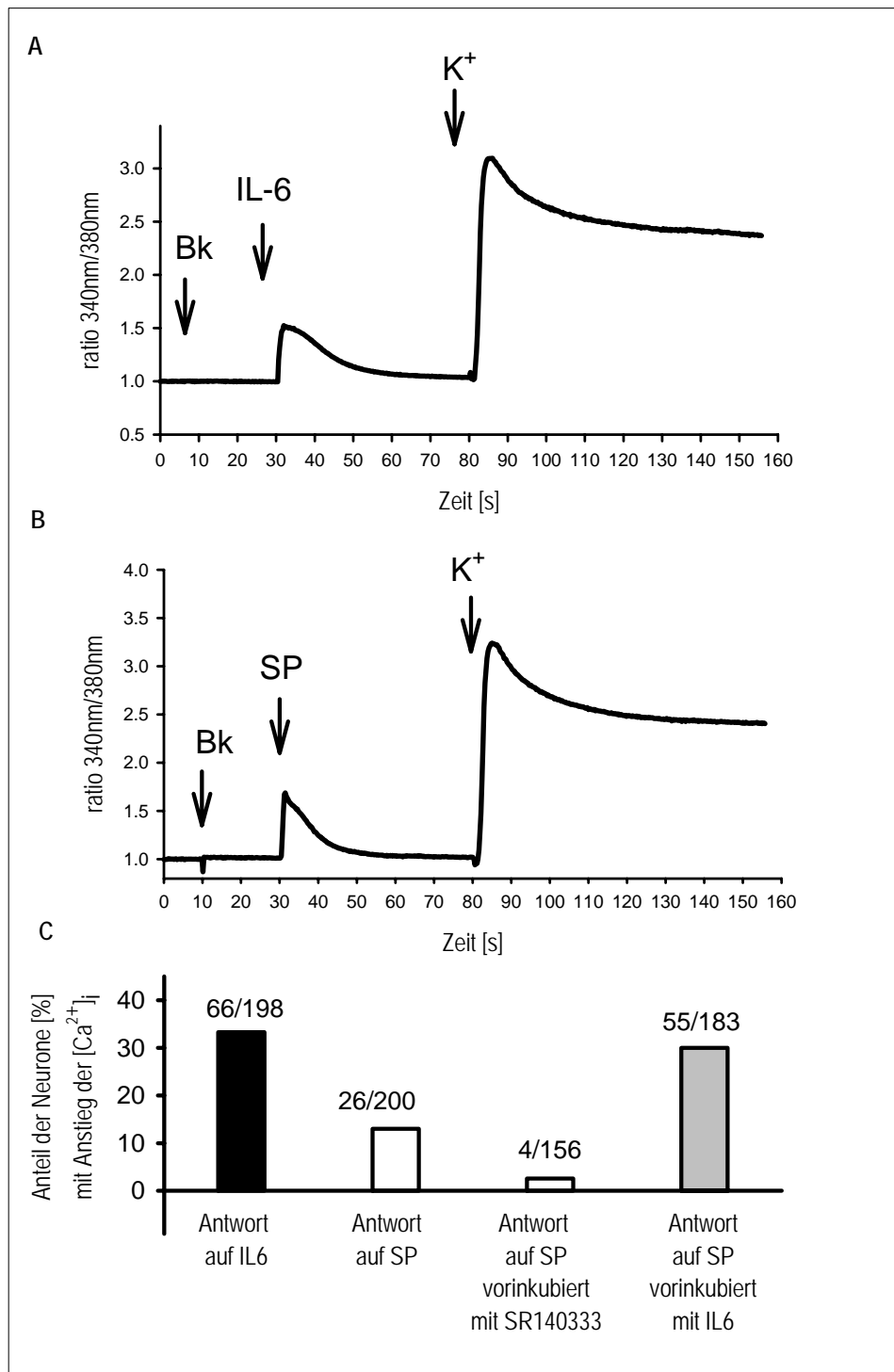


Abb. 15: Darstellung der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration von DRG – Neuronen nach Mediatorzugabe

15A zeigt den Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Zugabe von HEPES - Puffer (B) nach 10 s, nach IL6 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) nach 30 s und nach 50 mM K<sup>+</sup> nach 80 s. 15B zeigt den Verlauf der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Zugabe von HEPES - Puffer (B) nach 10 s, nach SP ( $10^{-4}$  M) nach 30 s und nach 50 mM K<sup>+</sup> nach 80 s. Abb. 15C zeigt die quantitative Auswertung zu den einzelnen Versuchsprotokollen (Zahlen im Text unter 4.1.5.).

## 4.2. Regulation des Bradykinin 2 – Rezeptors (B2 – Rezeptor)

### 4.2.1. Regulation des B2 – Rezeptors in Abhängigkeit von IL6

Um die Auswirkung von IL6 auf die Expression des B2 – Rezeptors zu untersuchen, wurden die DRG – Neurone mit IL6 der Konzentrationen  $5 \cdot 10^{-8}$  M,  $5 \cdot 10^{-7}$  M und  $5 \cdot 10^{-6}$  M, zugegeben in bekanntem Zugabeschema (siehe 3.4.1.), zusammen inkubiert. Der B2 – Rezeptor wurde mit goldgekoppeltem Bradykinin dargestellt (siehe 3.5.3). Die Markierung von Bradykinin – Gold konnte durch gleichzeitige Inkubation mit einem kompetitiven B2 – Antagonisten vollständig verdrängt werden. Wir konnten somit davon ausgehen, daß im verwendeten Kultursystem Bradykinin – Gold nur B2 – Rezeptoren markiert. Für jedes Regulationsexperiment mit den verschiedenen IL6 – Konzentrationen wurden jeweils 300 Zellen aus je 3 unabhängigen Kulturen ausgewertet. Abb. 16 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Für die B2 – Rezeptormarkierung mit der Zugabe von IL6 der Konzentration  $5 \cdot 10^{-8}$  M wurden  $45,33 \% \pm 14,74 \%$  der Zellen immunpositiv gewertet.  $54,33 \% \pm 13,65 \%$  der Zellen konnten für die Experimente mit IL6 – Zugabe der Konzentration  $5 \cdot 10^{-7}$  M positiv gewertet werden. Bei IL6 – Zugabe der Konzentration  $5 \cdot 10^{-6}$  M zeigten  $54,33 \% \pm 13,61 \%$  der Zellen eine positive Immunreaktion. 500 Zellen aus 5 unabhängigen Kulturen der Standardkultur wurden ausgewertet. Hier wurden die Zellen drei Tage ohne Zugabe von Mediatoren inkubiert. Dabei konnte für  $48 \% \pm 13,71 \%$  der Zellen eine positive Immunreaktion festgestellt werden. Zusammenfassend kann man sagen, daß IL6 verschiedener Konzentrationen keinen signifikant feststellbaren Einfluß auf die Regulation der Expression des B2 – Rezeptors im Vergleich zu den Standardkulturen hat.

Abb. 17 zeigt die Photographien repräsentativer Neurone mit B2 – Rezeptormarkierung ohne (17A) IL6 ( $10^{-7}$  M) – Zusatz oder Neurone mit Bradykinin – Gold - Markierung (17B). Abb. 17C zeigt Zellen der Kontrollgruppe, die mit goldgekoppeltem Bradykinin und einem B2 – Rezeptorantagonisten inkubiert wurden (siehe 3.5.3.).

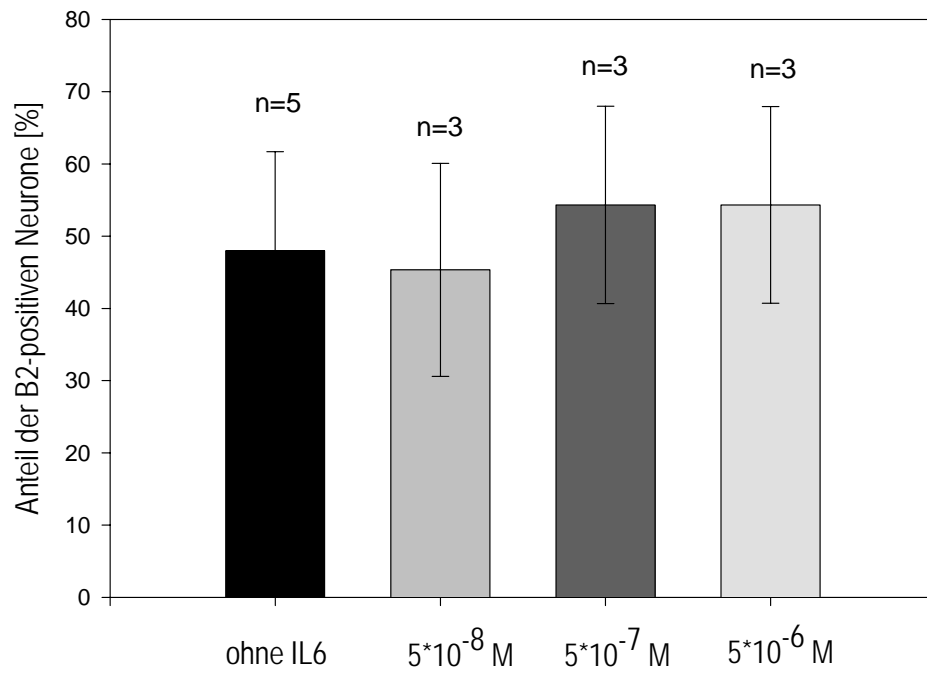


Abb. 16: Graphische Darstellung der B2 – Rezeptorexpression in Standardkulturen und bei Kulturen nach Zugabe von IL6 in unterschiedlichen Konzentrationen

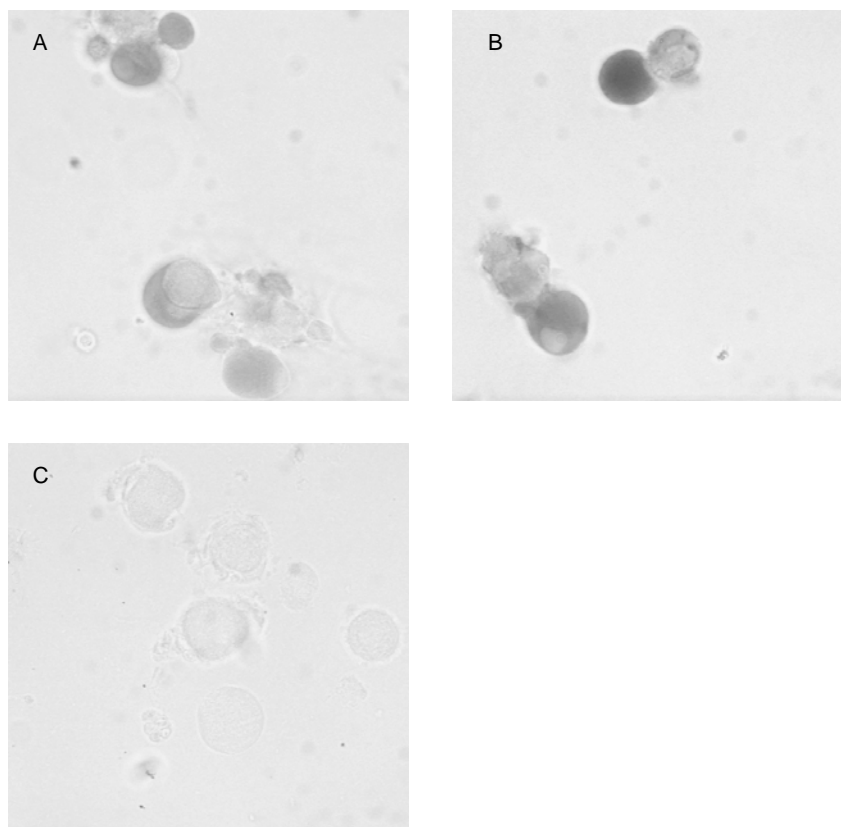


Abb. 17: Darstellung des B2 – Rezeptors an drei Tage kultivierten DRG – Neuronen mit goldgekoppelten Bradykinin und anschließender Silberfärbung  
 17A zeigt Neurone der Standardkultur. 17B zeigt Neurone nach Inkubation mit IL6  $5 \cdot 10^{-7}$  M.  
 17C zeigt Neurone der Verdrängungsexperimente, bei denen die Zellen mit goldgekoppelten Bradykinin mit B2 – Antagonisten inkubiert wurden.

Abbildung 18 zeigt die Grauwert- und Größenverteilung der Neurone der beschriebenen Kulturen. Im Grauwertbereich 0 – 0,16 sind die immunnegativen Zellen (weiße Balken) dargestellt. Ab Grauwert 0,16 sind die immunpositiven Zellen (schwarze Balken) dargestellt. Der Schnitt zwischen positiven und negativen Zellen wurde durch die Kontrollgruppen ermittelt, die ohne goldgekoppeltes Bradykinin inkubiert wurden. Bei allen Kulturen (Regulationsexperimente und Standardkultur) dehnt sich der Grauwertbereich der immunpositiven Zellen bis 0,5 aus. Der fehlende regulative Einfluß des IL6 kann auch hier verdeutlicht werden.

In der dargestellten Größenverteilung liegen die Zellgrößen aller Neurone im Bereich 20 – 1500  $\mu\text{m}^2$ . Es bestehen keine auffälligen Unterschiede sowohl innerhalb einer Kultur zwischen Zellen unterschiedlicher Immunreaktion als auch zwischen den verschiedenen Kulturen.

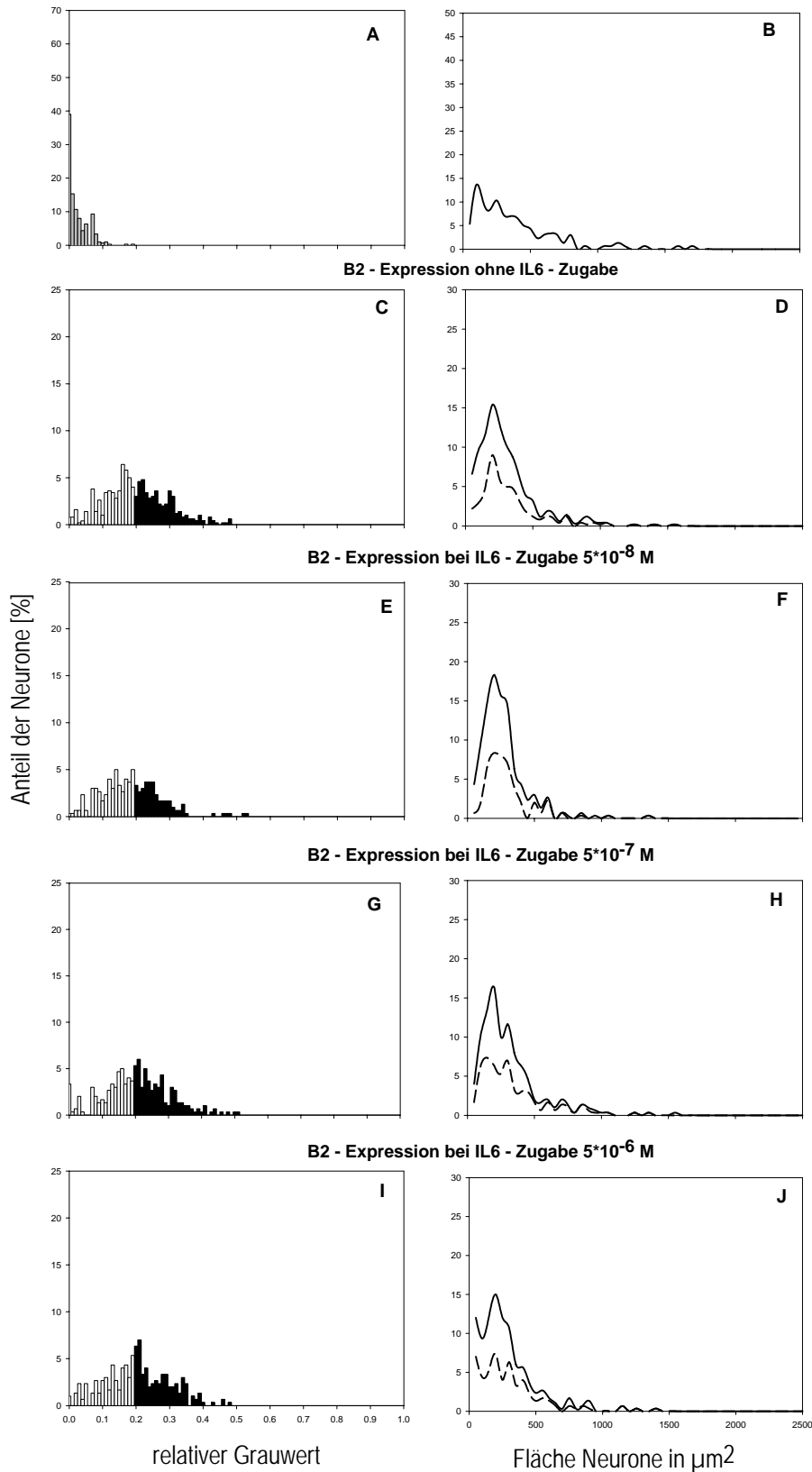


Abb. 18: Graphische Darstellung der relativen Grauwerte und der Größenverteilung der Neurone der Standardkultur und der Regulationsversuche mit IL6

Die Grauwertverteilung der positiven (schwarze Balken) und negativen (weiße Balken) Zellen der entsprechenden Kulturen sind in Abb. 18A, 18C, 18E, 18G und 18I dargestellt. Die Größenverteilung der positiven (unterbrochene Linie) und negativen (durchgezogene Linie) sind in Abb. 18B, 18D, 18F, 18H und 18J dargestellt.

#### 4.3. Darstellung des Glykoprotein 130 (Gp 130) an DRG – Neuronen

Das Glykoprotein 130 ist ein wichtiges Signaltransduktionsprotein in der Wirkkaskade von IL6. An Gp 130 bindet der Komplex aus IL6 – Rezeptor und IL6. Zur Markierung wurde ein anti – Gp – 130 – Antikörper verwandt. Das unter 3.5.2. beschriebene Vorgehen zur Gp – 130 – Markierung wurde in zwei Versuchsmodellen durchgeführt, wobei im ersten Ansatz Triton X-100 in den Lösungen enthalten war, im zweiten Ansatz wurden Lösungen ohne Triton X-100 verwandt. Für beide Ansätze wurden jeweils 400 Zellen aus 4 unabhängigen Kulturen ausgewertet.

Für das erste Versuchsmodell (mit Triton X-100) konnte für alle ausgewerteten Zellen eine positive Immunreaktion festgestellt werden, d.h. das Gp 130 konnte zu 100 % nachgewiesen werden. Im zweiten Versuchsansatz (ohne Triton X-100) konnte für  $18,25 \pm 5,74$  Zellen eine immunpositive Reaktion, und damit das Gp 130 nachgewiesen werden.

Fehlt der Zusatz von Triton X-100, kann nur das Gp 130 nachgewiesen werden, das sich auf der Membranoberfläche der DRG – Neurone befindet. Die durch Triton X-100 erwirkte Zellperforation ermöglicht dem Antikörper, auch intrazellulär Gp 130 zu binden. Aus den beiden Versuchsmodellen kann man schließen, daß der größte Anteil des Gp 130 intrazellulär lokalisiert ist. Das gilt für alle Neurone, d.h. jedes Neuron besitzt das Gp 130 und ist somit theoretisch in der Lage, auf eine IL6 – Einwirkung zu reagieren. Da aber nur 18 % der Zellen ein membranständiges Gp 130 besitzen, erklärt sich, daß nur dieser Anteil der Neurone im Kalzium - Imaging auf IL6 mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration antworten. In Abb. 19 sind beide Versuchsmodelle als Fotografie der DRG – Neuronenkultur und des histologischen Schnitts genannter Markierung dargestellt. Abb. 19A zeigt den histologischen Schnitt des Markierungsexperiments, welches als Zusatz Triton X-100 erhielt. Deutlich sichtbar ist der Großteil der Neurone dunkel gefärbt und damit positiv. Abb. 19B zeigt die Kontrollgruppe, wobei die Zellen der Schnitte ohne den anti – Gp – 130 – Antikörper inkubiert wurden. Die geringe Graufärbung verdeutlicht die immunnegative Reaktion aller Zellen. Abb. 19C zeigt das Bild der Kultur der Neurone, denen zur Markierung Triton X-100 zu den Lösungen zugesetzt wurde. Alle Neurone sind deutlich positiv und damit dunkel gefärbt. Die Einzelvergrößerung eines Neurons im Bild zeigt die durchgehende Färbung intrazellulär. Im Gegensatz dazu kann man in Abb. 19D vor allem in der Einzelvergrößerung des Neurons nur die

Färbung in der Nähe der Zellmembran erkennen, wenn kein Triton X-100 zugesetzt war. Abb. 19E zeigt die mitgeführte Kontrollgruppe, in der alle Zellen immunnegativ reagieren.

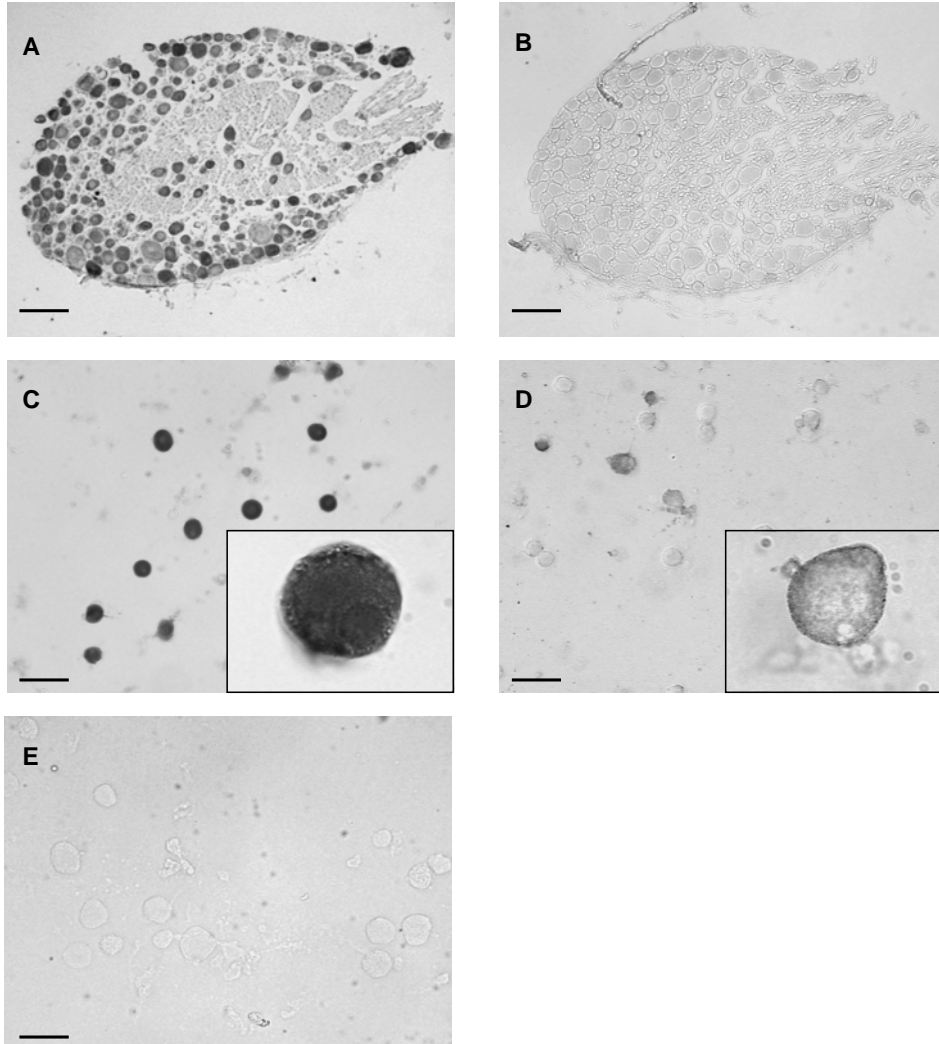


Abb. 19: Darstellung des Gp 130 an drei Tage kultivierten DRG – Neuronen mit anti – Gp – 130 – Antikörper

19A zeigt den Zellschnitt der Kultur mit Triton X-100, 19B den Zellschnitt der Kontrollgruppe. 19C zeigt die Kultur der Zellen mit Triton X-100 und Einzelvergrößerung eines Neurons, während 19D die Kultur der Zellen ohne Triton X-100 mit Einzelvergrößerung eines Neurons zeigt. 19E zeigt die Kultur der Kontrolle, die ohne primären Antikörper inkubiert wurde. Der Balken in 19A und 19B entspricht einer Länge von 125  $\mu\text{m}$ . Der Balken in 19C – 19E entspricht einer Länge von 60  $\mu\text{m}$ .

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt die Expression des Neurokinin 1 (NK1) – und des Bradykinin 2 (B2) - Rezeptors unter dem Einfluß von Interleukin 6 (IL6) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) an kultivierten Neuronen der Hinterwurzelganglien (DRG - Neurone) der Ratte. Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet die Studie von Segond von Banchet et al. (2000), die am Modell einer Antigen – induzierten Arthritis (AIA) am Rattenknie die Veränderung der Rezeptorexpression für Substanz P (SP) und Bradykinin an kultivierten DRG – Neuronen zeigt. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, welchen Einfluß IL6 als pleiotropes Zytokin auf die Regulation des NK1 – und des B2 – Rezeptors hat, da folgende Hinweise existieren, die eine Beteiligung von IL6 an der genannten Rezeptorregulation vermuten lassen: So wurde während der AIA auch im nicht entzündeten Knie neben einem erhöhten Anteil an SP und Calcitonin gene-related Peptide (CGRP) (Malcangio et al. 1999) unter anderem ein erhöhter Anteil an Interleukin 6 (IL6) gefunden (Mentzel und Bräuer 1998). Ein Ziel der aktuellen Schmerzforschung ist es, die Parameter, die die Regulation des NK1 – und des B2 – Rezeptors während einer Entzündung beeinflussen, aufzudecken. Das kann als methodischer Ansatz für die Entwicklung einer effektiven Therapie von vor allem chronischen Schmerzzuständen dienen, die z.B. bei der Arthritis typisch sind.

Insgesamt konnte festgestellt werden, daß IL6 die vermehrte Expression des NK1 – Rezeptors, den Rezeptor für SP, induzieren kann (siehe 4.1.1). Dieser Langzeiteffekt von IL6 am NK1 – Rezeptor läßt sich funktionell mit der Kalzium - Imaging – Technik verifizieren (siehe 4.1.5.). Kurzzeiteffekte von IL6 auf die NK1 - Expression innerhalb der ersten 120 min konnten dagegen nicht beobachtet werden (bisher unveröffentlichte Ergebnisse). SP fördert die periphere und zentrale Sensibilisierung nozizeptiver Neurone (siehe 1.2.2. und 1.4.) und muß daher im Prozeß der Schmerzentstehung beachtet werden.

Um den Signaltransduktionsweg von IL6 zu untersuchen, wurde eine im Signalweg wichtige Kinase, die Mek-Kinase, inhibiert, wonach sich die beobachteten IL6 – Effekte nicht mehr darstellen ließen (4.1.2.). Bei Experimenten mit dem Mek-Kinase – Inhibitor zusammen mit PGE<sub>2</sub> wurde der induzierende Effekt von PGE<sub>2</sub> auf den NK1 – Rezeptor ebenfalls zum Teil verhindert (siehe 4.1.3.). So kann vermutet werden, daß die Mek-Kinase in die Signaltransduktionswege von IL6 und PGE<sub>2</sub> involviert ist. IL6 besitzt aber keinen regulativen Effekt auf die PGE<sub>2</sub> – Freisetzung (siehe 4.1.4.).



Auf die Expression des B2 – Rezeptor, den Rezeptor für Bradykinin, hat IL6 ebenfalls keinen signifikant nachweisbaren Einfluß (siehe 4.2.1.).

Das Glykoprotein 130 (Gp 130) wurde als Bestandteil des IL6 – Rezeptorkomplexes dargestellt (siehe 4.3.).

#### 5.1. Gp 130 – Expression und akute Effekte von IL6

Alle Zytokine vom IL6 – Typ rekrutieren das Gp 130 zu ihrem Rezeptorkomplex (Heinrich et al. 1998). Daher ist Gp 130 auch eine wichtige Untereinheit des IL6 – Rezeptorkomplexes. Die mRNA von Gp 130 wird ubiquitär im gesamten Nervensystem exprimiert (Ip et al. 1992, Watanabe et al. 1996) und ist auch in peripheren Nerven und in Hinterwurzelganglien (DRG) präsent (Banner und Patterson 1994). Es wird in der aktuellen Literatur weiterhin gezeigt, daß Gp 130 an allen DRG – Neuronen lokalisiert ist (Gardiner et al. 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Thesen. Mittels Immunhistochemie konnte Gp 130 an allen DRG – Neuronen sowohl im Zellschnitt als auch in Kultur nachgewiesen werden. Das zeigt die potentielle Antwortmöglichkeit der Neurone auf den Einfluß von IL6 oder anderen Mitgliedern der Zytokine vom IL6 – Typ. Ebenfalls wird deutlich, daß nahezu alle DRG – Neurone theoretisch auf IL6 antworten können, wenn die weiteren Bestandteile des IL6 – Rezeptorkomplexes vorhanden sind. Um die Verteilung von Gp 130 an den DRG – Neuronen detaillierter zu untersuchen, wurden die immunhistochemischen Experimente ohne Zusatz von Triton X-100 zum Puffer an kultivierten Zellen durchgeführt, da der anti – Gp 130 – Antikörper nur die extrazelluläre Aminosäuresequenz (Aminosäure 365 – 619) des Gp 130 markiert. Dabei zeigten im Gegensatz zum Versuchsmodell mit Triton X-100 zum Puffer, bei dem in allen Zellen zytosolisch lokalisiertes Gp 130 dargestellt werden konnte, hier nur 18 % der Neurone eine positive Immunreaktion. Das läßt darauf schließen, daß nur die 18 % der Neurone das Gp 130 nahe der Plasmamembran exprimiert haben. Daher kann man annehmen, daß nur eine Untergruppe der DRG - Neurone einen funktionellen IL6 – Rezeptorkomplex rekrutieren kann.

Bei den Experimenten mit der Kalzium - Imaging – Technik zeigten 33 % der Neurone eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach akuter Zugabe von IL6. Hieraus muß man schließen, daß ca. ein Drittel der Neurone einen

funktionellen Rezeptorkomplex bilden kann. Die Diskrepanz der Ergebnisse beider Methoden kann auf deren unterschiedliche Sensitivität zurückgeführt werden.

Wie schon erwähnt, besteht der IL6 – Rezeptorkomplex aus mehreren Teilen (siehe 1.7.4.). Während das Gp 130 ubiquitär exprimiert wird, exprimieren nur eine kleine Anzahl von Zellen, z.B. Hepatozyten, Monozyten, einige B- und T- Zellen, den IL6 – Rezeptor (Peters et al. 1998). Verschieden Studien weisen darauf hin, daß die pathophysiologischen Effekte stark vom Vorhandensein des löslichen IL6 – Rezeptors (sIL6-R) abhängig sind.

So zeigen Obreja et al. (2001), daß IL6 zusammen mit sIL6-R eine Steigerung der Hitze – induzierten CGRP – Freisetzung der Haut induziert und damit zu einer Sensibilisierung der Neurone und zur Entwicklung einer Hyperalgesie führt, während IL6 allein dazu nicht in der Lage ist. Die Autoren vermuten, daß die Neurone nicht den löslichen Rezeptor, aber das Signaltransduktionsmolekül Gp 130 exprimieren.

Thier et al. (1999) zeigen an Paraffinschnitten von DRG`s eine hohe zytoplasmatische Immunreaktion für den IL6 – Rezeptor, was darauf hinweist, daß IL6 eine Wirkung auf die DRG – Neurone besitzt. Weiterhin stellt die Arbeitsgruppe fest, daß exogen zugesetztes IL6 zusammen mit seinem löslichen Rezeptor trophische Bedeutung für die DRG – Neurone in Kultur besitzt, während endogen sezerniertes IL6 keinen Einfluß auf das Überleben der kultivierten Neurone zeigt. Die Autoren schlußfolgerten, daß die DRG – Neurone nicht ausreichend den membrangebundenen IL6 – Rezeptor (IL6-R) exprimieren.

Die eigenen Resultate aus der Kalzium - Imaging – Technik setzen voraus, daß der sIL6-R vorhanden sein muß, denn weder IL6 noch der IL6-R allein binden oder aktivieren Gp 130, was effektiv bedeutet, daß der heterodimere Komplex IL6/sIL6-R Zellen aktivieren kann, die normalerweise nicht auf IL6 antworten können, weil sie nicht die membrangebundene IL6 - Rezeptorform exprimieren können (Kallen 2002). 33 % der Neurone, die durch Einfluß von IL6 mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration antworten, exprimieren das Gp 130, welches in Verbindung mit dem sIL6-R rekrutiert werden kann und die Voraussetzung für eine erfolgreiche Signaltransduktion schafft. Die lösliche Rezeptorform entsteht durch Splicing oder durch Freisetzung von der membrangebundenen Form (Kallen 2002). Weder die akuten Effekte von IL6 auf die Freisetzung der intrazellulären Kalziumkonzentration der Neurone noch Langzeiteffekte von IL6 auf die Expression des NK1 – Rezeptors

(siehe 5.2.) lassen sich durch Zugabe von sIL6-R erhöhen (bisher nicht gezeigte Ergebnisse).

Interessant erscheint daneben die Tatsache, daß dem Gp 130 eine Doppelfunktion zukommt. Einerseits generiert membrangebundenes Gp 130 die Signaltransduktion von IL6, während andererseits lösliches Gp 130, welches ebenfalls durch alternatives Splicing entsteht (Heinrich et al. 1998), einen Schutz vor Überregulation darstellt, indem lösliches Gp 130 den IL6/sIL6-R – Komplex neutralisiert (Narazaki et al. 1993).

## 5.2. Langzeiteffekte von IL6 am Beispiel der NK1 – Rezeptorexpression

Der NK1 – Rezeptor für SP ist im Normalfall in 10 % der Neurone, im Entzündungsfall, wie bei einer AIA, bis in 50 % der Neurone exprimiert (Segond von Banchet et al. 2000). IL6 wird bei Patienten mit rheumatoider Arthritis im Serum gefunden (Mentzel und Bräuer 1998). Weiterhin ist IL6 zusammen mit sIL6-R bei der Destruktion des arthritischen Gelenkes, nämlich beim Zusammenbruch des Knorpelkollagens, beteiligt, was die positive Korrelation zwischen Arthritis – Aktivität und IL6 – Spiegel im Serum erklären könnte (Franke et al. 1997, Straub et al. 1997, Polgàr et al. 2000). Neben diesen Studien zur Bedeutung von AIA und IL6, existieren zahlreiche Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die die Bedeutung von Nozizeption und IL6 näher charakterisieren.

So wird berichtet, daß IL6 mechanische und thermische Hyperalgesie verursacht, wenn es in den Fuß von Ratten injiziert wird (Wagner und Myers 1996). Verhaltensstudien mit IL6 – „Knock out“ – Mäusen zeigen reduzierte Hyperalgesie nach Entzündungen und Nervendurchtrennung (Zhong et al. 1999, Murphy et al. 2000).

Daneben charakterisieren Oprée und Kress (2000) und Obreja et al. (2001) die Entwicklung einer hitzeinduzierten Hyperalgesie an Nozizeptoren der Haut von Ratten infolge von IL6 und seinem Rezeptor *in vitro* und *in vivo*. In beiden Modellen kann bei Vorhandensein von IL6 und dem Rezeptor ein Anstieg von CGRP beobachtet werden. CGRP ist in vielen Neuronen mit SP kolokalisiert und unterstützt dessen Wirkung, was in einer erhöhten Entladungsrate nozizeptiver Neurone resultiert (Schaible und Schmidt 1997).

Diese Resultate deuten darauf hin, daß IL6 eine wichtige, nicht – immunologische Bedeutung bei der Arthritis haben könnte. So wäre es denkbar, daß IL6 bei der

Entwicklung der mechanischen Hyperalgesie bei einer AIA beteiligt ist, da proinflammatorische Zytokine, wie es auch IL6 ist, bei neuropathischen Schmerzmodellen (Cunha et al. 1992) und bei Entzündungsschmerzmodellen (Wagner und Myers 1996) immer vermehrt exprimiert und sezerniert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß IL6 die NK1 – Rezeptorexpression an DRG - Neuronen *in vitro* erhöhen kann (30 % versus 10 %). Das vermehrte Vorhandensein dieses Rezeptors ermöglicht eine erhöhte Bindungsmöglichkeit von SP an seinen Rezeptor, woraus eine Sensibilisierung der Neurone resultieren kann. Das wiederum könnte in einer verstärkten Schmerzwahrnehmung gipfeln. Funktionelle Hinweise auf diese Tatsache liefern die Ergebnisse der Kalzium - Imaging – Methode. Während ca. 10 % der Neurone der Normalkultur mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach akuter Zugabe von SP reagieren, konnte bei mit IL6 vorinkubierten Zellen bei 30 % der Neurone eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit und in vorausgegangener Studie (Segond von Banchet et al. 2003) gezeigt, daß PGE<sub>2</sub> ebenfalls die Expression des NK1 – Rezeptors erhöhen kann (40 % versus 10 %). Die Hochregulation durch PGE<sub>2</sub> erfolgt über einen Adenylatzyklase – Proteinkinase A – abhängigen Weg (Segond von Banchet et al. 2003).

Mittels ELISA wurden die Überstände der Neuronenkulturen untersucht und festgestellt, daß die PGE<sub>2</sub> – Konzentrationen der Kulturen, die IL6 erhielten, nicht erhöht waren und den Konzentrationen der Standardkulturen entsprachen (siehe 4.1.4.). Hieraus kann man schlußfolgern, daß die IL6 – induzierte NK1 – Hochregulation kein indirekter Effekt des PGE<sub>2</sub> sein kann.

### 5.3. Die Rolle der Mek-Kinase bei der Signaltransduktion von IL6

Nach der Bindung von IL6 an seinen Rezeptor und Zusammenlagerung des IL6 – Rezeptorkomplexes sind prinzipiell 2 Hauptwege in der Signaltransduktion bekannt, die aktiviert werden können. Auf der einen Seite führt die Rezeptorkomplex-zusammenlagerung zur Aktivierung der Jak – (Januskinase) – Tyrosinkinase, die nach Phosphorylierungen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch STAT (signal transduction and activators of transcription) führt (Heinrich et al. 2003). Auf

der anderen Seite wird das Glykoprotein Ras angelagert und die Signalkaskade Mek-Kinase – MAPK (mitogen activated protein kaskade) aktiviert (Heinrich et al. 2003).

Da für IL6 und PGE<sub>2</sub> ein induzierender Effekt auf den NK1 – Rezeptor bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit der Transduktionsweg Mek-Kinase – MAPK zur Untersuchung der Signalweiterleitung gewählt, da hier Anlaß zur Vermutung besteht, daß diese Signalkaskade von beiden Mediatoren benutzt wird. Es ist nämlich bekannt, daß für die PGE<sub>2</sub> – ausgelösten Effekte die Kaskade Adenylatzyklase – zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) – Proteinkinase A (PKA) wichtig ist (Segond von Banchet et al. 2003). Daneben stellten Dikic und Blaukat (1999) fest, daß die Aktivierung der PKA den Mek-Kinase – MAPK – Weg aktivieren kann. Ein weiteres Beispiel aus der Literatur zeigt, daß die IL6 – Freisetzung im Zentralnervensystem durch die Reduzierung des cAMP – Spiegels verhindert werden kann (Grimaldi et al. 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Effekte von IL6 und PGE<sub>2</sub> durch Zugabe eines Mek-Kinase – Inhibitors verhindert werden können. Der Effekt des IL6 wird vollständig, der Effekt von PGE<sub>2</sub> dagegen nur teilweise inhibiert. Man kann daher annehmen, daß sich die Signaltransduktionswege von IL6 und PGE<sub>2</sub> zumindest zum Teil überlappen, wobei die Mek-Kinase in beide Signalwege involviert zu sein scheint.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß IL6 nicht zu einer vermehrten Freisetzung von PGE<sub>2</sub> führt, sind die Effekte beider Mediatoren doch in einem Zusammenhang zu betrachten. Sowohl IL6 als auch PGE<sub>2</sub> bewirken eine Hochregulation des NK1 – Rezeptors an DRG - Neuronen. Ebenfalls sind bei beiden Rezeptoren die Effekte durch den Mek-Kinase – Inhibitor oder durch Somatostatin (Grimaldi et al. 1997, Segond von Banchet et al. 2003) inhibierbar. Daher kann man zusammenfassend annehmen, daß IL6 und PGE<sub>2</sub> prinzipiell in verschiedenen Mediator – Rezeptor – Systemen involviert sind, die Signalkaskaden aber doch an einzelnen Stellen ineinander greifen. Beispielhaft hierfür können in beiden Signalkaskaden die Mek-Kinase oder cAMP genannt werden. Bedeutung kann das für die Entwicklung bestimmter Pharmaka haben, die die Ausschüttung spezieller proinflammatorischer Zytokine mit dem Ziel der Entzündungshemmung und Schmerzlinderung verhindern sollen, da durch die Blockierung eines Proteins die Signalweiterleitung mehrerer Mediatoren gehemmt werden kann.

#### 5.4. Langzeiteffekte von IL6 am Beispiel der Bradykinin 2 (B2) – Rezeptorexpression

Bradykinin ist ein wichtiger Entzündungsmediator, der an den B2 – Rezeptor bindet, der unter normalen Bedingungen an sensorischen Neuronen exprimiert wird, während der Bradykinin 1 (B1) – Rezeptor nur im Entzündungsfall exprimiert wird (Dray und Perkins 1993, Perkins et al. 1993, Davis und Perkins 1994). Verschiedene Studien weisen jedoch kontroverse Ergebnisse bezüglich der Rezeptorexpression auf. Überraschenderweise läßt sich nach AIA am Rattenknie nur eine Hochregulation des B2 – Rezeptors, nicht aber des B1 – Rezeptors feststellen. Die Hochregulation des B2 – Rezeptors persistiert während der chronischen Entzündungsphase (Segond von Banchet et al. 2003). Newton et al. (2002) stellen hingegen eine Hochregulation des B1 – und des B2 – Rezeptors bei menschlichen Epithelien des Atemwegstraktes durch den Einfluß proinflammatorischer Zytokine fest. An menschlichen Zellen der Glomeruli kann im Entzündungsfall keine Hochregulation des B1 – Rezeptors, wohl aber des B2 – Rezeptors festgestellt werden (Costenbader et al. 1997).

Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte für IL6 als proinflammatorisches Zytokin kein signifikant nachweisbarer Einfluß auf die B2 – Rezeptorexpression festgestellt werden

Die unterschiedlichen Resultate der Studien in Bezug auf die Bradykinin – Rezeptorexpression machen deutlich, daß zwar die Bedeutung von Bradykinin als Entzündungsmediator hinreichend beschrieben worden ist, die Rezeptorexpression jedoch immer noch unzureichend verstanden ist. Gerade hier sind zukünftig noch weitere Studien notwendig, da die Bradykininrezeptoren vor allem in der chronischen Entzündungsphase exprimiert bleiben und hier entsprechende Therapieansätze benötigt werden.

## 6. Schlußfolgerungen

Es ist ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis der Interaktion von Schmerz- und Immunsystem gelungen, indem in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Interleukin 6 (IL6) auf die Neurokinin 1 (NK1) – Rezeptorexpression dargestellt werden konnte. So scheint IL6 bei einer AIA nicht – immunologische Bedeutung im Sinne der Schmerzwahrnehmung zu besitzen, da nach Einfluß von IL6 eine Hochregulation des NK1 – Rezeptors festgestellt werden kann. So ist wie bei allen Krankheiten auch bei Autoimmunkrankheiten die Kenntnis der Pathogenese auf molekularer Ebene von größter Bedeutung, da dann eine effektive Therapie besonders der chronischen Schmerzzustände möglich ist.

Erste therapeutische Versuchsansätze sind bekannt, bei denen beispielsweise Zytokine, die während der AIA dominant sind, neutralisiert werden sollen (Choy und Panayi 2001). Weiterhin sind die Rezeptorblockade durch Antikörper präsenster Zytokine oder die Aktivierung antiinflammatorischer Signalwege denkbar (Choy und Panayi 2001).

Es sind allerdings noch weitere Studien nötig, um die molekularen Vorgänge bei der Bradykinin - Rezeptorexpression zu klären. Daneben muß die Überlappung der Signalkaskaden von IL6 und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) näher charakterisiert werden. Es ist weiterhin wichtig, die Mechanismen zu verstehen, die für die Ausbildung des IL6 – Rezeptorkomplexes wichtig sind. Denn obwohl jedes Neuron der Hinterwurzelganglien der Ratte das Glykoprotein 130 besitzt, ist nur ein Drittel der Neurone praktisch in der Lage, das Glykoprotein 130 in die Zellmembran einzubauen und damit auf IL6 zu antworten.

Weiterhin ist festzuhalten, daß es sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit um *in vitro* – Versuche handelt, die *in vivo* verifiziert werden müssen. So muß weiterhin an der vollständigen Aufklärung krankheitsauslösender Faktoren der rheumatoiden Arthritis gearbeitet werden. Daneben müssen anhand der Ergebnisse der Grundlagenforschung, zu denen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezählt werden können, wirksame Medikamente entwickelt werden, die dann auf Verträglichkeit und Wirksamkeit *in vivo* getestet werden müssen.

Zusammenfassend ist in Abb. 20 die Rolle von IL6 und PGE<sub>2</sub> auf die NK1 – Rezeptorexpression in Berücksichtigung verschiedener Signaltransduktionswege dargestellt. Die Darstellung versucht schematisch den Teilaspekt der Ergebnisse

dieser Arbeit darzustellen und erhebt keineswegs den Anspruch auf Vollständigkeit im Sinne der Erfassung der komplexen Zusammenhänge der Rezeptorexpression durch die Regulation von Entzündungsmediatoren.

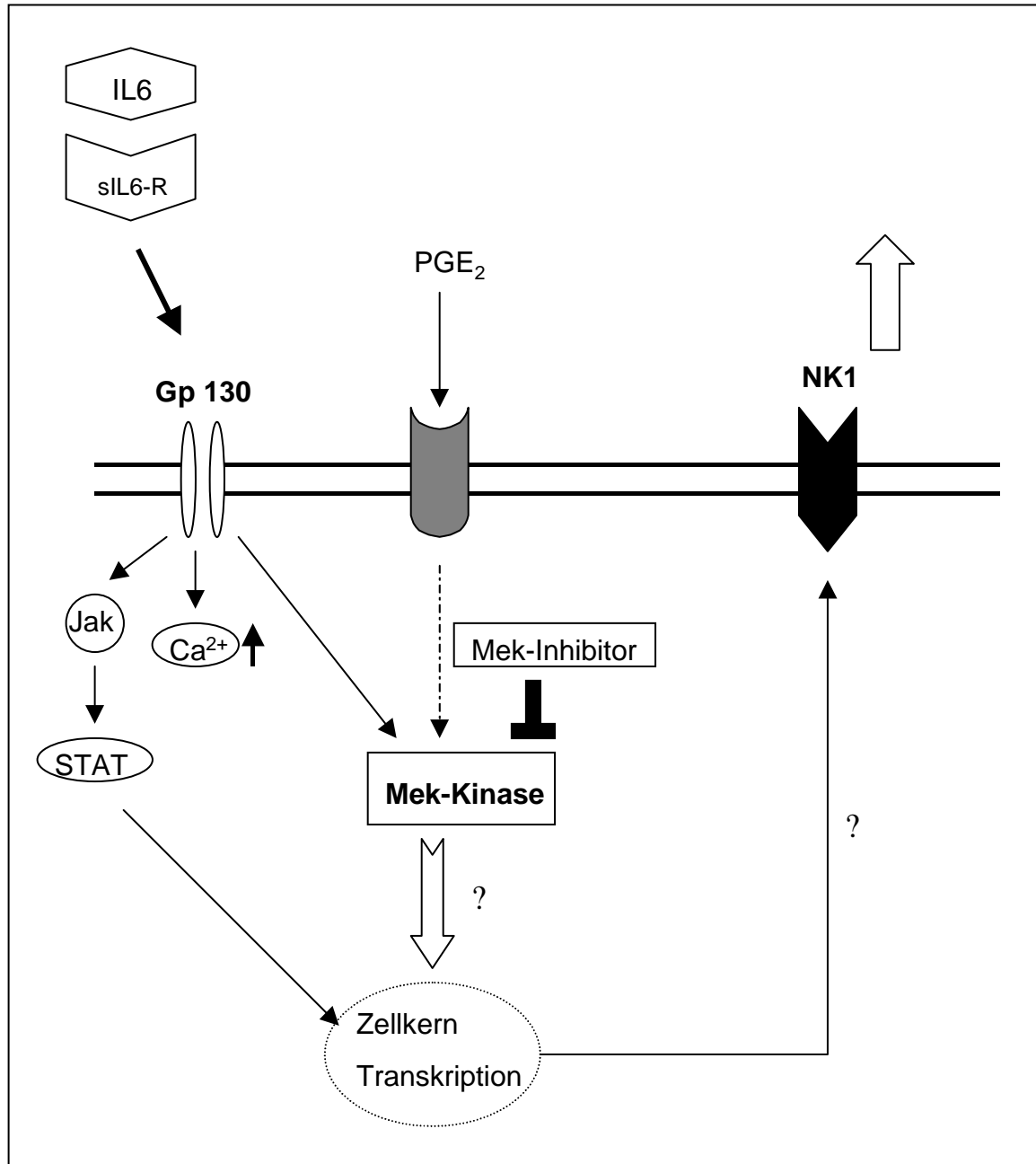


Abb. 20: Schematische Darstellung der NK1 – Rezeptorexpression durch IL6 und PGE<sub>2</sub> in Berücksichtigung verschiedener Signaltransduktionswege

IL6 Interleukin 6, sIL6-R löslicher Interleukin 6 – Rezeptor, PGE<sub>2</sub> Prostaglandin E<sub>2</sub>, NK1 Neurokinin 1 – Rezeptor, Gp 130 Glykoprotein 130, Jak Januskinase, STAT signal transduction and activators of transcription,  $Ca^{2+}$  Kalziumion, Mek-Kinase mitogen activated protein – Kinase, Mek-Inhibitor mitogen activated protein - Inhibitor



## 7. Literatur- und Quellenverzeichnis

Baenkler HW. 2001. Bewegungsapparat. In: Bob A, Bob K, Hrsg. Innere Medizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1634.

Banner LR, Patterson PH. 1994. Major changes in the expression of the mRNAs for cholinergic differentiation factor and its receptor after injury to adult peripheral nerves and ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(15):7109-7113.

Bär KJ, Natura G, Telleria-Diaz A, Teschner P, Vogel R, Vasquez E, Schaible HG, Ebersberger A. 2004. Changes in the effect of spinal prostaglandin E (EP1 – EP4) receptors in spinal nociceptive processing of input from the normal or inflamed knee joint. *J Neurosci*, 24(3):642-651.

Brechenmacher C, Larmet Y, Feltz P, Rodeau JL. 1998. Cultured rat sensory neurons express functional tachykinin subtypes 1, 2 and 3. *Neurosci Lett*, 241(2-3):59-162.

Bourne JA. 1989. Handbuch 1 der Immunperoxidase Färbemethoden. Hamburg: Diagnostika GmbH.

Choy EHS, Panayi GS. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344(12):907-914.

Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA. 1999. Ion channels gated by heat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):7658-7663.

Costenbader K, Ardaillou N, Marchetti J, Ardaillou R. 1997. Prostaglandin E<sub>2</sub> enhances type 2 – bradykinin receptor expression in human glomerular podocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1358(2):142-152.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. 1992. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 107(3):660-664.

Davis AJ, Perkins MN. 1994. Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology*, 33:127-133.

Dikic I, Blaukat A. 1999. Protein tyrosine kinase-mediated pathways in G protein-coupled receptor signaling. *Biochem Biophys Acta*, 30:369-387.

Donnerer J, Schuligoi R, Stein C, Amann R. 1993. Upregulation, release and axonal transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in adjuvant inflammation and regulatory function of nerve growth factor. *Regul Peptides*, 46:150-154.

Dray A, Perkins M. 1993. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci*, 16(3):99-104.

Franke S, Herrmann D, Hein G, Muller A, Stein G. 1997. Interleukin-6, soluble interleukin-2-receptor and soluble interleukin-6-receptor in sera of patients with rheumatoid arthritis: influences of disease activity and drug therapy. *Eur J Med Res*, 2(9):401-406.

Gardiner NJ, Cafferty WBJ, Slack SE, Thompson SWN. 2002. Expression of gp 130 and leukaemia inhibitory factor receptor subunits in adult rat sensory neurones regulation by nerve injury. *J Neurochem*, 83(1):100-109.

Gold MS, Dastmalchi S, Levine JD. 1996. Co-expression of nociceptor properties in dorsal root ganglion neurons from the adult rat in vitro. *Neuroscience*, 71:265-275.

Grimaldi A, Florio T, Schettini G. 1997. Somatostatin inhibits interleukin 6 release from rat cortical type I astrocytes via the inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 255:242-248.

Gross WL. 2003. Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. In: Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W, Hrsg. *Innere Medizin*. Fünfte Auflage. Jena, München: Urban und Fischer.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6):3440-3450.

Handwerker HO. 2000. Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/jak/stat pathway. *Biochem J*, 334:297-314.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. 2003. Principles of interleukin (il)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(1):1-20.

Helfgott DC, Ray LT, Sthoeger Z, Tamml PB, Sehgal PB. 1987. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta-2-interferon by human fibroblasts. *J Exp Med*, 166(5):1300-1309.

Hingtgen CM, Vasko MR. 1994. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res*, 655:51-60.

Ip NY, Nye SH, Boulton TG, Davis S, Taga T, Li Y, Birren SJ, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson DJ. 1992. CNTF and lif act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the il-6 signal transducing receptor component gp 130. *Cell*, 69:1121-1132.

Kallen KJ. 2002. The role of transsignalling via the agonistic soluble il-6 receptor in human diseases. *Biochem Biophys Acta*, 1592(3):323-343.

Klein J. 1991. Immunologie. Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH-Verlag, 238-330

Koike K, Nakahata T, Takagi M, Kobayashi T, Ishiguro A, Tsuji K, Naganuma K, Okano A, Akiyama Y, Akabane T. 1988. Synergism of beta-2-interferon, interleukin-6 and interleukin-3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free cultures. *J Exp Med*, 168(3):890-979.

Kress M, Reeh PW. 1996. Chemical excitation and sensitization in nociceptors. In: Belmonte C, Cervero F, editors. *Neurobiology of nociceptors*. Oxford: Oxford University Press, 258-297.

Kress M, Reeh PW, Vyklicki L. 1997. An interaction of inflammatory mediators and proton in small diameter dorsal root ganglion neurons of rats. *Neurosci Lett*, 244(1):37-40.

Kress M, Guthmann C, Averbeck B, Reeh PW. 1999. Calcitonin gene – related peptide, substance P and prostaglandin E2 release from rat skin induced by antidromic nerve stimulation. *Neuroscience*, 89:303-310.

Lidell E, Weeks I. 1996. *Antikörper-Techniken*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum-Verlag.

Löffler G, Petrides PE. 1998. *Biochemie und Pathobiochemie*. 26te Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 206-918.

Malcangio M, Bowery NG. 1999. Peptide autoreceptors: does an autoreceptor for substance P exist? *Trends Pharmacol Sci*, 20(10):405-407.

Mentzel K, Bräuer R. 1998. Matrix metalloproteinases, iL-6 and nitric oxide in rat antigen-induced arthritis. *Clin Exp Rheum*, 16:269-276.

Meßlinger K. 1997. Was ist ein Nozizeptor? *Schmerz*, 11:353-366

Murphy PG, Borthwick LA, Altares M, Gauldie J, Kaplan D, Richardson PM. 2000. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurone. *Eur J Neurosci*, 12(6):1891-1899.

Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. 2002. The paradigm of il-6 from basic science to medicine. *Arthritis Res*, 4(3):233-242.

Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. 1993. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp 130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp 130. *Blood*, 82(4):1120-1126.

Newton R, Eddleston J, Haddad EB, Hawisa S, Mak J, Lim S, Fox AJ, Donnelly LE, Fan Chung K. 2002. Regulation of kinin receptors in airway epithelial cells by inflammatory cytokines and dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 441(3):193-202.

Obreja O, Schmelz M, Poole S, Kress M. 2001. Interleukin-6 in combination with its soluble il-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat in vivo. *Pain*, 96(1-2):57-62.

Oprée A, Kress M. 2000. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$ , il-1 $\beta$  and il-6 but not il-8 in the development of heat hyperalgesia effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *Neuroscience*, 20:6289-6293.

Peters M, Müller AM, Rose-John S. 1998. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor direct stimulation of gp 130 and hematopoiesis. *Blood*, 92:3495-3504.

Perkins MN, Campbell E, Dray A. 1993. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg<sup>9</sup>,[Leu<sup>8</sup>]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain*, 53:191-197.

Polgár A, Brózik M, Tóth S, Holub M, Hegyi K, Kádár A, Hodinka L, Falus A. 2000. Soluble interleukin-6 receptor in plasma and in lymphocyte culture supernatants of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit*, 6(1):13-18

Riede UN, Olah AJ, Goebel HH, Mohr W, Peter HH, Höpker WW, Gerlach UV, Werner M. 2004. Lokomotorisches System. In: Riede UN, Werner M, Schäfer HE, Hrsg. Allgemeine und spezielle Pathologie. Fünfte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1115-1140.

Rose-John S, Heinrich PC. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors, generation and biological function. *Biochem J*, 300(1):281-290.

Schaible HG, Grubb BD. 1993. Afferent und spinal mechanism of joint pain. *Pain*, 55(1):5-54

Schaible HG, Schmidt RF. 1997. Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt RF, Thews G, Hrsg. Physiologie des Menschen. 27te Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 236-249.

Schaible HG, Schmidt RF. 2000. Pathophysiologie von Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F, Hrsg. Physiologie des Menschen, 28te Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 236-249.

Schaible HG, Vanegas H. 2000. How do we manage chronic pain. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*, 14(4):797-811.

Schneider M. 1997. Rheumatologie. In: Van Husen N, Schneider M, Wagner H, Hrsg. Innere Medizin für Zahnmediziner. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 205-207.

Segond von Banchet G, Heppelmann B. 1995. Non-radioactive localization of substance P binding sites in rat brain and spinal cord using peptides labeled with 1,4-nm gold particles. *J Histochem Cytochem* 43(8):821-827.

Segond von Banchet G, Schaible HG. 1999. Lokalisation of neurokinin 1 receptor on a subset of substance P – positive and IB4 – negative neurons of the rat. *Neurosci Lett*, 274(3):175-178.

Segond von Banchet G, Petrow PK, Bräuer R, Schaible HG. 2000. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res*, 2(5):424-427.

Segond von Banchet G, Scholze A, Schaible HG. 2003. Prostaglandin E<sub>2</sub> increases the expression of the neurokinin 1 receptor in adult sensory neurones in cultures, a novel role of prostaglandins. *Br J Pharmacol* 139(3):672-680.

Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD. 1992. Lehrbuch der inneren Medizin. New York, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 599-657.

Straub RH, Müller-Ladner U, Lichtinger T, Schölmerich J, Menninger H, Lang B. 1997. Decrease of interleukin 6 during the first 12 months is a prognostic marker for clinical outcome during 36 month treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Br J Rheumatol*, 36:1298-1303.

Szucs P, Polgar E, Spigelman I, Porszasz R, Nagy, I. 1999. Neurokinin-1 receptor expression in dorsal root ganglion neurons of young rats. *J Peripher Nerv Syst*, 4:270-278.

Thier M, März P, Otten U, Weis S, Rose-John, S. 1999. Interleukin-6 (il-6) and its soluble receptor support survival of sensory neurons. *J Neurosci Res* 55(4):411-422.

Tsien R Y. 1988. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci*, 11(10): 419-424.

Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ. 1994. Prostaglandine E<sub>2</sub> enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci*, 14(8):4987-4997.

Wagner R, Myers RR. 1996. Endoneurial injection of tnfa produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport*, 7(18):2897-2901.

Watanabe D, Yoshimura R, Khalil M, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T, Kiyama H. 1996. Characteristic localization of gp 130 (the signal-transducing receptor component used in common for il-6/il11/cntf/lif/osm) in the rat brain. *Eur J Neurosci*, 8(8):1630-1640.

Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins DR, Black JA. 1999. Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(14):7635-7639.

Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, Kopf M, Heumann R. 1999. Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *Neuroscience*, 19:4305-4313.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Michaela Kiehl  
geboren am: 01.10.1979  
Geburtsort: Weißenfels  
Familienstand: ledig  
Eltern: Christina Kiehl, geb. Labitzke; Detlef Kiehl  
Beruf der Eltern: Zahnärzte

### Schulbildung:

1987 – 1992 Borlachschole Bad Kösen  
1992 – 1993 Domgymnasium Naumburg  
1993 – 1994 Lepsiusgymnasium Naumburg  
1994 – 1998 Landesschule Pforta, Spezialzweig Naturwissenschaften  
07/1998 allgemeine Hochschulreife

### Studium:

10/1998 – 12/2003 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Uni. Jena  
01/2004 – 12/2004 Promotionsstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
07/2003 – 12/2003 Staatsexamen Zahnmedizin

### Berufliche Laufbahn:

- 01/2004 Approbation als Zahnärztin  
- seit 03/2004 Teilzeitanstellung als Assistenz Zahnärztin in der  
Gemeinschaftspraxis Kiehl, Bad Kösen

### Wissenschaftliche Laufbahn:

- 07/2001 Annahme als Doktorand am Institut für Physiologie 1 der  
FSU Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Schaible  
- 2002 – 2004 Versuchsdurchführung, Datenerfassung und verfassen der  
Dissertationsschrift

Jena, 19.11.2004

Michaela Kiehl

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologie 1 der Friedrich – Schiller – Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-G. Schaible angefertigt. Ihm danke ich, daß ich dieses interessante und für die Grundlagenforschung wichtige Thema bearbeiten durfte und mir alle Arbeitsmittel zur Verfügung gestellt wurden. Weiterhin möchte ich ihm meinen Dank für sein persönliches Engagement und seine konstruktive Kritik an meiner Arbeit aussprechen.

Von ganzem Herzen möchte ich Frau PD Dr. G. Segond von Banchet danken. Sie hat wesentlichen Anteil am Entstehen dieser Arbeit gehabt, indem sie mich bei den experimentellen Arbeiten hervorragend betreute. Weiterhin unterstützte sie mich bei der Lösung von Problemen durch ihre unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Ihr persönliches Interesse führte zum zügigen Fortgang meiner Arbeit, wofür ich Ihr ebenfalls meinen besonderen Dank aussprechen möchte.

Für die gewissenhafte und zuverlässige Assistenz bei den experimentellen Arbeiten danke ich im Besonderen Frau Antje Wallner. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Physiologie 1 möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die familiäre und freundliche Atmosphäre danken.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern besonderen Dank aussprechen, die den Fortgang meiner Arbeit stets mit Interesse verfolgt haben. Sie haben mich jederzeit kritisch und ehrlich beraten und großzügig unterstützt.

Abschließend möchte ich meinem Lebenspartner Thomas Schmeißer danken, der mich ebenfalls hilfreich beraten hat und mir bei allen gestaltungstechnischen Fragen meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. H.-G. Schaible, Frau Dr. G. Segond von Banchet,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 19.11.2004

Michaela Kiehl, Verfasserin